THESE

PARIJS

DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée à

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

par

CLAUDE JEANTET

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES

Recherches sur les processus de maturation et les activités de traduction des ribosomes chez Escherichia coli.

Soutenue le : 13 NOV. 1975 devant la commission d'examen :

M. R. MONIER	Président
M^elle^. A.L. HAENNI	Examinateurs
M. F. GROS	
M. G. BUTTIN	
M. G. STÖFFLER	
M. D. BLANGY	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548111_0028

A MES PARENTS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

(Le taureau voit rouge lorsque son leurre lui tombe sous le nez; les deux rouges coïncident, celui de la colère et celui de la cape : le taureau est en pleine analogie, c'est-à-dire en plein imaginaire. Lorsque je résiste à l'analogie, c'est en fait à l'imaginaire que je résiste : à savoir : la coalescence du signe, la similitude du signifiant et du signifié, l'homéomorphisme des images, le Miroir, le leurre captivant. Toutes les explications scientifiques qui ont recours à l'analogie - et elles sont légion - participent du leurre, elles forment l'imaginaire de la Science).

Roland BARTHES par Roland BARTHES

La démarche scientifique intéresse (le moi) parce qu'elle refuse le respect du mystère. Rupture idéologique, antagoniste du jeu des contraires, elle ne peut être intégrée par la déviation permanente du scientisme présent sous des formes éphémères, mais reconduites du mystère païen.

Païen ou non, le mystère est toujours païen. La religion est l'organisation d'un ordre païen. Elle est structurée dans l'imaginaire, réglée pour un engagement dans la lutte politique. Son pluralisme est l'apparent marchandage de fractions substituables gardiennes d'un monolithique intérêt.

Refuser le respect du mystère n'est pas admettre une ultime lecture des objets, ni les prémices génératrices d'ordres nouveaux, mais refuser le final connoté dans l'éternel d'une idéologie de l'universel.

Cette situation vis-à-vis du descriptif est une reconnaissance de la contradiction comme élément antagoniste permanent de l'éternel. Notre démarche étrangère au sacré, est avant tout un combat politique, elle ne se situe pas en dehors de l'idéologique.

Au cours de la vie d'un individu des faits rares transforment par leur exceptionnelle importance l'aléatoire quotidien en évènement. Voici quelques années le Professeur Roger Monier m'acceptait dans son laboratoire : ce fut mon évenement.

Je dois au Professeur Roger Monier à la fois mon initiation à la recherche scientifique dans le domaine de la Biologie Moléculaire et ma position universitaire. Sans la qualité et la rigueur de ses conseils et l'exceptionnelle patience du pédagogue je n'aurai su franchir les portes de la Biologie Moléculaire. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression d'une reconnaissance fidèle et le témoignage de ma profonde amitié.

Je tiens à exprimer mes sentiments de sincère gratitude à Monsieur François Gros, Professeur au Collège de France, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Il a toujours manifesté à mon égard la plus grande générosité. L'attention bienveillante avec laquelle il a pu suivre ce travail, les critiques et suggestions qu'il a pu formuler ont été pour moi une aide et un encouragement des plus précieux. Je suis infiniment honoré d'une telle confiance et conscient de la chance exceptionnelle qui m'est ainsi offerte de bénéficier de ses enseignements.

Je désire affirmer une reconnaissance particulière au Docteur Georg Stöffler avec lequel j'ai eu une courte mais combien riche collaboration. Je suis très honoré de sa participation à mon jury.

Je voudrais remercier le Docteur Anne-Lise Haenni qui me fait l'amitié et le très grand honneur d'accepter de juger ce travail.

J'adresse ici mes remerciements à Messieurs les Professeurs Gérard Buttin et Daniel Blangy pour leur aide permanente sans laquelle je n'aurai pu affronter les comportements ubuesques qui caractérisent l'U.E.R. de Biochimie de l'Université Pierre et Marie Curie. Je suis très sensible à l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury.

Ce travail doit beaucoup à mon ami Roberto Acantara Gomes et à Lucienne Legault dont les collaborations m'ont été constamment précieuses et si souvent nécessaires. Je suis heureux de l'occasion qu'il m'est donnée pour leur témoigner ma profonde reconnaissance.

Nombreux sont ceux qui m'ont entouré de leurs conseils. Roland Rosset, Jacqueline Julien, Jean-Claude Lelong, Jean Thibault, Dominique Lazar, Reinhardt Maschler, Danièle Gros, Viviane Caput et Geneviève Antolini m'ont à des moments différents témoigné leurs encouragements indispensables à la vie quotidienne d'un laboratoire. Qu'ils soient assurés de mon amitié.

Je tiens à remercier Denise Chillet, Madame Arlaud, Roselyne Jourdan pour leur aide technique qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Je ne voudrais pas que le témoignage de ma reconnaissance manque ici à mon ami Maurice Connat à qui je dois une aide précieuse.

Je veux remercier Madame Picarda, Sabine Samuel, Marie-Hélène Penhoat, Marie-France Legrand, Madame Rouxel, Monsieur Reinié, Jean-Pierre Martin et Daniel Rousseaux qui ont à des titres divers participé à la réalisation de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

	Page
Introduction générale	10
Chapitre Premier : La Formation des Ribosomes.	12
1. Recherche de précurseurs ribosomiques	13
2. Dissection et reconstitution du ribosome	16
3. Maturation des rRNA et biogénèse des ribosomes	17
I - EFFETS DE LA PARAFLUOROPHENYLALANINE SUR LA FORMATION DES RIBOSOMES DE ESCHERICHIA COLI	19
1. Souches et techniques biochimiques utilisées	19
2. Cinétique de formation des sous-unités 30 S et 50 S en présence de PFP.	21
3. Stabilité des particules ribonucléoprotéiques des cellules traitées à la PFP.	24
4. Nature des RNA ribosomiques synthétisés en présence de PFP.	29
5. Evolution des particules ribonucléoprotéiques des cellules traitées à la PFP.	29
II - EFFETS DE LA CARENCE EN PHOSPHORE SUR LA FORMATION DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES ACCUMULEES EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE.	38
1. Propriétés des particules 30 S et 50 S synthétisées en présence de chloramphénicol.	39
2. Synthèse de particules ribonucléoprotéiques chez les souches bactériennes Rel A⁻ carencées en un acide aminé.	42
A - Formation de particules 30 S et 50 S au cours d'une carence en arginine.	46
B - Synthèse de particules ribonucléoprotéiques par des bactéries auxotrophes pour la méthionine et carencées en phosphore.	47
a) Capacité des cellules EA2 carencées en phosphore à former des particules ribonucléoprotéiques en absence de synthèse protéique.	50
b) Transformation in vivo des particules 40 S - 45 S après restauration de la méthionine.	58

Page

III - MODIFICATIONS IN VIVO DES RNA RIBOSOMIQUES AU COURS DU PROCESSUS D'ASSEMBLAGE DES RIBOSOMES REALISE EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE. 67

1. Identification du RNA 5 S dans les particules ribonucléoprotéiques formées en absence de protéique. 68

a) Présence du RNA 5 S dans les particules 50 S formées par des cellules traitées au chloramphénicol. 69

b) RNA de faible poids moléculaire présent dans les particules 40 S - 45 S synthétisées en absence de méthionine par la souche EA2 carencée en phosphore. 71

2. Propriétés des RNA macromoléculaires présents dans les particules 30 S ou 28 S accumulées en absence de synthèse protéique. 74

3. Effets de l'incorporation du 5 fluorouracile sur l'assemblage des ribosomes. 80

Conclusion et Discussion 86

Chapitre II : Participation des protéines de la sous-unité 30 S à la traduction des RNA messagers naturels. 97

1. Effets des fragments Fab sur la traduction du RNA tardif du phage T4. 100

2. Effets des fragments Fab sur la traduction du RNA du phage R 17. 104

3. Propositions pour une classification des protéines de la sous-unité 30 S en relation avec leurs fonctions. 106

4. Comparaison des propositions relatives à la participation des protéines de la sous-unité 30 S dans l'activité du ribosome. 110

Conclusion. 122

Chapitre III : Régulation de l'expression génétique au au niveau de la traduction. 125

A - INFLUENCE DU MODE D'INHIBITION DE LA TRADUCTION SUR L'ACTIVITE DES FACTEURS D'INITIATION DE LA SYNTHESE PROTEIQUE. 134

Page

1. Capacité des extraits de cellules carencées en acide aminé ou traitées par les antibiotiques à traduire les mRNA naturels. 135

2. Origine de l'inhibition des ribosomes de cellules traitées par le chloramphénicol. 138

3. Etude des facteurs d'initiation isolés à partir de bactéries traitées par les antibiotiques ou carencées en acide aminé. 152

4. Inhibition in vitro de l'activité des facteurs d'initiation. 159

5. Stabilité de l'activité du facteur IF 3 et cycle ribosomique. 191

B - ACTION DU ppGpp SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE IN VITRO 199

1. Effets du ppGpp sur la synthèse protéique dirigée par les mRNA naturels ou le poly U. 202

2. Effet du ppGpp sur l'initiation de la traduction 202

3. Effet du ppGpp sur la fixation de Phe-tRNA au site A du ribosome et sur l'activité du facteur EF Tu. 206

4. Action du nucléoside tétraphosphate sur la réaction de polymérisation des chaines peptidiques. 208

5. Activité du ppGpp sur les facteurs de la traduction. 212

Conclusion : Deux formes de contrôle de l'expression génétique au niveau de la traduction. 214

Conclusion générale. 217

Bibliographie. 220

Abréviations. 238

L'ensemble des travaux que nous rapportons dans ce mémoire est relatif à l'étude, chez les procaryotes, de trois phénomènes qui participent à un même projet cellulaire : la traduction génétique.

Le premier phénomène a trait à la biosynthèse des sous-unités ribosomiques. Les modifications de la croissance cellulaire induites par la présence d'un analogue de la phénylalanine, la parafluorophénylalanine, favorisent l'étude de particules ribonucléoprotéiques précurseurs des ribosomes. L'accroissement du pool intracellulaire de protéines ribosomiques libres, conséquent à une carence en phosphore permet de déterminer la participation de ces protéines à certains événements postranscriptionnels qui règlent la maturation des RNA ribosomiques. Action de la parafluorophénylalanine et carence en phosphore sont les deux situations que nous avons exploitées.

Nous présentons ensuite les résultats obtenus au cours de notre recherche sur la participation des protéines de la sous-unité 30 S aux sites actifs du ribosome impliqués dans la synthèse protéique. Cette étude a été réalisée à l'aide de la technologie empruntée au domaine de l'immunologie, nous avons déterminé l'effet des anticorps dirigés contre chacune des protéines ribosomiques de la sous-unité 30 S, sur la traduction in vitro des RNA messagers naturels.

Le troisième phénomène abordé intéresse la régulation de l'expression génétique au niveau de la traduction. Stabilité relative in vivo et in vitro des facteurs d'initiation de la synthèse protéique, effets du guanosine tétraphosphate sur les

différentes étapes de la traduction sont les deux voies que nous avons explorées.

Biosynthèse, sites d'action et régulation du fonctionnement des ribosomes chez Escherichia coli, forment donc les trois volets qui structurent la présentation de ce mémoire.

Chapitre premier

LA FORMATION DES RIBOSOMES

Le concept de ribosome ne signifie pas une permanence anatomique, mais nomme une réalité fonctionnelle : de fait, l'organite qu'il désigne, le monosome, est formé de deux sous-unités qui changent de partenaire après chaque cycle de traduction (1,2).

La stabilité de ce mécanisme implique que cet échange, si nécessaire soit-il au bon fonctionnement de la synthèse protéique, ne puisse avoir lieu qu'entre des particules capables, de par leur structure, d'une reconnaissance réciproque permanente. Ceci est une condition indispensable à l'efficacité du processus de traduction.

De cette reconnaissance, requise pour la formation d'un monosome 70 S, on ne doit pas déduire que la composition de toutes les sous-unités appartenant à l'une des deux classes est identique. Sans que cette propriété ne soit affectée, le contenu en protéines des sous-unités d'une même classe peut varier d'une particule à l'autre (3,4) et dépend des conditions de culture (5,6). Cette variabilité se retrouve partiellement au niveau des RNA ribosomiques comme le révèle l'analyse de leur structure primaire (7,8,9,10), ou le laisse prévoir la multiplicité des cistrons à partir desquels ils sont transcrits (11,12,13).

Ces remarques préliminaires indiquent les limites que nous devons donner à notre présentation du problème de la biosynthèse du ribosome, étant entendu que nous admettons par ailleurs la définition généralement admise selon laquelle cet organite est composé de trois RNA et de cinquante cinq protéines. Une telle définition implique que la sous-unité 30 S soit le produit de l'assemblage du RNA 16 S et de 21 protéines, et que la sous-unité 50 S provienne de l'association de 34 protéines, du RNA 23 S, et du RNA 5 S.

1. - LA RECHERCHE DE PRECURSEURS RIBOSOMIQUES

Il existe une relation étroite entre la croissance cellulaire et la synthèse des ribosomes. Des variations de la première affectent immédiatement la transcription des RNA ribosomiques. C'est seulement une fois accomplie cette modification que le taux de synthèse des autres molécules (RNA messagers, protéines solubles, DNA) acquiert les valeurs caractéristiques des nouvelles conditions de culture (14,15). On s'est servi de cette extrême sensibilité de la transcription des RNA ribosomiques aux modifications de la croissance cellulaire, pour définir différentes approches favorables à l'étude de la biogénèse des ribosomes. De par le nombre des constituants de l'organite, cette biogénèse, résultat d'un processus d'assemblage des différentes macromolécules, requiert un haut degré d'organisation. Les caractères cinétiques de cette organisation permettent de déceler des produits ribonucléoprotéiques intermédiaires, pré-

curseurs des sous-unités ribosomiques. Afin de faciliter l'identification de ces précurseurs, on a exploité différentes situations susceptibles de favoriser leur accumulation. La recherche de ces situations s'est développée selon trois axes différents.

C'est ainsi que certains travaux qui s'inscrivent dans la tradition du groupe Carnegie à Washington (16 et voir les monographies 17,18) ont fait appel soit à des techniques de marquage bref (19,20,21), soit à des modifications de la croissance bactérienne. Le groupe d'Osowa étudie les particules formées au cours d'une période d'accélération d'un taux de la croissance bactérienne, provoquée par un enrichissement du milieu de culture (17,22,23,24) ou après un ralentissement de ce taux par addition de faibles doses (0,6 -1,5 µg/ml) de chloramphénicol (25). D'autres auteurs ont utilisé les particularités de la carence en magnésium, cause de dégradation des ribosomes, pour étudier, après restauration de l'ion limitant, la biogénèse de l'organite dans des cellules au métabolisme peu actif. Dans cette situation, la formation de sous-unités 30 S et 50 S n'est décelable que deux heures après l'addition de magnésium (26).

Le deuxième domaine s'est développé à partir de la découverte de particules ribonucloéprotéiques 18 S et 25 S accumulées en absence de synthèse protéique, par des cellules qui conservent leur capacité de transcrire les cistrons des RNA ribosomiques (27,28). Cette observation avait permis de formuler une hypothèse qui devait orienter l'activité de nombreux laboratoires. En effet, pour la plupart des auteurs, ces particules 18 S et 25 S correspondaient à de véritables précurseurs ribosomiques composés de RNA macromoléculaires et des premières protéines ribosomiques qui participent aux processus d'assemblage. Le pool intracellulaire de ces protéines dites

"précoces" devait être, au regard de cette hypothèse, plus élevé que celui des protéines dites "tardives" nécessaires à la formation des sous-unités complètes. Arrêt de la synthèse protéique sans inhibition de la transcription des RNA ribosomiques telle était la condition recherchée. Addition de fortes doses de chloramphénicol (28, 29), de streptomycine (30), de puromycine (31,32), de chlortétracycline (33), de 5 méthyl-tryptophane (34), substitution du potassium par le sodium à des souches potassium dépendantes (35), carence en un acide aminé essentiel chez des cellules Rel A$^-$ (36,37) sont autant de situations qui provoquent, en effet, chez des bactéries en croissance exponentielle, la formation de particules 18 S et 25 S.

Le fait que la restauration de la traduction permette aux RNA ribosomiques inclus dans ces particules de participer à la formation de sous-unités (35,37,38,39), autorisait à considérer ces composés 18 S et 25 S comme des précurseurs des ribosomes. Une telle affirmation était corroborée par la présence de constituants de même coefficient de sédimentation dans des extraits bactériens de cellules prélevées au cours d'une restauration en magnésium (26,40). Cependant, l'analyse des protéines de ces particules révélait qu'entre elles existait une grande hétérogénéité (28,29). De plus, la quantité réduite des protéines ribosomiques libres dans la cellule (inférieure à 5 % de s protéines totales), ne pouvait rendre compte d'une telle accumulation de précurseurs (20,41). En fait, il a été montré que de telles particules étaient formées au cours de la réalisation des extraits cellulaires par association non spécifique des protéines solubles avec des produits de trans-

cription primaires des RNA ribosomiques macromoléculaires (42,43).

C'est vers la génétique que s'est orienté le troisième axe de recherche. Le nombre élevé des macromolécules nécessaires à la formation d'un ribosome accroit la probabilité d'isoler des mutants défectueux dans leur processus d'assemblage. Par ailleurs, le fait que le ribosome assure une fonction cellulaire fondamentale, laissait prévoir que de tels événements génétiques affecteraient essentiellement des mutants conditionnels.

De tels mutants ont été isolés. Certaines mutations modifient à la fois l'assemblage des deux sous-unités, ce sont des mutants cryosensibles (44,45,46,47). D'autres empêchent aux températures non permissives la formation des sous-unités 30 S : ces mutants sont soit cryosensibles (48), soit thermosensibles (47), enfin, une troisième catégorie d'entre eux accumule les précurseurs de la sous-unité 50 S (46,49, 50,51).

2. - DISSECTION ET RECONSTITUTION DU RIBOSOME

Les études in vitro, destinées à analyser le mécanisme d'assemblage des ribosomes ont consisté soit à dépouiller "séquentiellement" l'organite de ses constituants (52 - 57), soit à reconstituer les sous-unités 30 S et 50 S à partir des différentes macromolécules isolées (voir les monographies de Nomura (58) et de Garrett et Wittmann (59)).

Cette seconde approche qui s'est développée depuis les premiers travaux de Traub et Nomura (60) a permis non seu-

lement de proposer un modèle décrivant l'addition séquentielle des différents constituants (46), mais aussi de définir la participation de telle ou telle macromolécule à une ou plusieurs fonctions nécessaires à la synthèse protéique.

L'analogie entre les modèles d'assemblage proposés à partir des résultats d'expériences réalisées in vitro et ceux qui rendent compte du processus normal de la synthèse des ribosomes a pu être établie dans certains cas en comparant la composition des précurseurs isolés in vivo avec celle des particules obtenues in vitro (59,61).

3. - MATURATION DES rRNA ET BIOGENESE DES RIBOSOMES

Les résultats obtenus à partir des expériences réalisées in vivo ou in vitro ont permis de déceler les événements essentiels qui président à la biosynthèse des ribosomes.

a) Les produits de la transcription des cistrons codant pour les RNA ribosomiques subissent plusieurs types de modifications avant de participer à la constitution d'un ribosome biologiquement actif. Le produit initial, qui selon de nombreux auteurs forme une unité de transcription (62-64), donne trois types de macromolécules précurseurs des RNA ribosomiques. Ces précurseurs subissent un raccourcissement de leur chaine polynucléotidique (48,65-68) et, à l'exception du RNA 5 S, des modifications qui entrainent la formation de composants mineurs tels que l'acide pseudoridylique (69,70) ou la méthylation du ribose (70) ou des bases (71) de certains nucléotides. Ces modifications nécessitent une synthèse protéi-

que active (72). La nature des protéines ribosomiques semble influencer le processus de maturation des RNA ribosomiques (46,47).

b) In vivo l'assemblage est un phénomène dont les propriétés cinétiques permettent d'observer des précurseurs. L'accumulation de ces précurseurs dépend pour une souche donnée, des conditions de la croissance cellulaire.

Les seules macromolécules composant un ribosome contiennent l'information nécessaire à la constitution in vitro d'une sous-unité ribosomique biologiquement active. Dans de telles conditions, les protéines du 30 S sont incapables d'assurer la maturation d'un RNA précurseur du RNA 16 S. Les particules formées en présence de cette forme de RNA ont un coefficient de sédimentation égal à 30 S mais sont inactives dans la synthèse protéique.

Dans notre travail, nous avons identifié des précurseurs ribosomiques accumulés in vivo par des cellules cultivées en présence de la parafluorophénylanine (PFP). Dans ces conditions, on modifie les propriétés cinétiques de la croissance bactérienne. Nous avons analysé la nature des RNA qu'ils renferment et avons étudié leur capacité à traduire in vivo les RNA messagers.

Par ailleurs, nous nous sommes proposés d'examiner in vivo la participation des protéines ribosomiques à la maturation des RNA ainsi que l'influence de la méthylation dans la biogénèse des sous-unités 30 S et 50 S. Pour ce faire, nous avons utilisé des conditions de culture qui permettent la formation de ribosomes à partir de rRNA transcrits en absence

de synthèse protéique active, et de protéines ribosomiques libres accumulées après dégradation de ribosomes préexistants. De telles conditions ont été décrites par J. Julien et coll. (73), elles font appel aux effets de la carence en phosphore.

I - EFFETS DE LA P.FLUOROPHENYLALANINE SUR LA FORMATION DES RIBOSOMES DE ESCHERICHIA COLI

L'addition de la parafluorophénylalanine (PFP) dans le milieu d'une culture d'Escherichia coli modifie la cinétique de la croissance bactérienne qui perd sa forme exponentielle et devient linéaire (74). Ce phénomène dû à l'incorporation de l'analogue dans les protéines bactériennes néosynthétisées (75) par sa substitution à la phénylalanine (76) n'entraîne donc pas un arrêt de la synthèse protéique, pas plus qu'il n'inhibe la formation des RNA (77). Seules certaines enzymes ne sont plus produites (74) alors que d'autres sont moins stables (78). L'influence de la PFP dans la biosynthèse des ribosomes peut s'exercer indirectement au travers de la modification des caractéristiques de la croissance, mais aussi directement, les protéines ribosomiques renferment, en effet, 3,18 % de phénylalanine (79).

1. - SOUCHES ET TECHNIQUES BIOCHIMIQUES UTILISEES

Les expériences ont été faites avec la souche d'Escherichia coli ML 308 ($i^- z^+ y^+$) provenant du Dr. Gros. Les bactéries sont cultivées à 30°C sur un milieu minéral type 68

(80) contenant 0,4 % de glucose et 5. 10^{-4} M de PO_4H_2K. L'addition de la D.L.PFP (Sigma) à une concentration finale de 10^{-3} M, a lieu quand la culture a atteint une densité optique égale à 2,00. Cette densité est déterminée à 420 nm par mesure néphélométrique, à l'aide d'un spectrophotomètre Jean et Constant (Prolabo, Paris). Lors des marquages par des précurseurs des acides nucléiques, les traceurs radioactifs sont ajoutés après 20 minutes d'incubation des cellules en présence de l'analogue. La récolte des cellules se fait à 4°C, celles-ci sont lavées avec le tampon utilisé pour la préparation de leur extrait.

Sauf indication contraire, les extraits des bactéries traitées à la PFP sont réalisés en présence de 20 fois leur poids frais de cellules non traitées, par passage dans une French Pressure Cell (Aminco) dans un tampon Tris HCl 5.10^{-3}M pH 7.4 renfermant selon les cas 10^{-4} M ou 10^{-2} M de $MgCl_2$. On a vérifié que l'addition de cellules normales ne modifiait en rien la nature et le comportement des produits formés en présence de PFP.

Les particules ribonucléoprotéiques ont été isolées par centrifugation sur gradient de saccharose (5 - 20 %). L'extraction des RNA par déprotéinisation a été réalisée selon la technique décrite par Marcot Queiroz et Monier (55). Les RNA ont été analysés par chromatographie sur colonne de sérum albumine méthylée selon la méthode de Mandell et Hershey (81), modifiée par Rosset et coll. (82).

2. - CINETIQUE DE FORMATION DES SOUS-UNITES 30 S ET 50 S EN PRESENCE DE PFP

Dans nos conditions de culture, l'addition de l'analogue modifie immédiatement la cinétique de la croissance (fig. 1). La comparaison des extraits cellulaires obtenus à partir de bactéries cultivées en présence ou en absence de l'analogue et marquées pendant des temps différents au $^{32}P - PO_4 HNa_2$ révèle des variations dans l'évolution du profil des particules ribonucléoprotéiques néosynthétisées (fig. 2). Chaque prélèvement a été effectué pour les mêmes accroissements de densité optique de la culture traitée et de la culture non traitée à la PFP. Ces accroissements sont ceux observés après 15 minutes, 30 minutes et 45 minutes de marquage, d'une culture contenant de la PFP.

Le fait que nous ayons observé que des bactéries marquées pendant 75 minutes en présence de PFP ont un profil ribonucléoprotéique analogue à celui de cellules non traitées exposées 30 minutes au $^{32}P - PO_4 HNa_2$, nous conduit à penser que l'addition de l'analogue pourrait provoquer un ralentissement du processus de biosynthèse des ribosomes.

L'analyse des extraits de bactéries cultivées en présence de PFP montre non seulement un rapport élevé de sous-unités 30 S comparées aux sous-unités 50 S, mais aussi l'accumulation d'une particule 43 S (fig. 2B, fig. 3A). De plus, si des cellules cultivées dans les mêmes conditions sont ouvertes dans un tampon contenant une concentration 100 fois plus forte

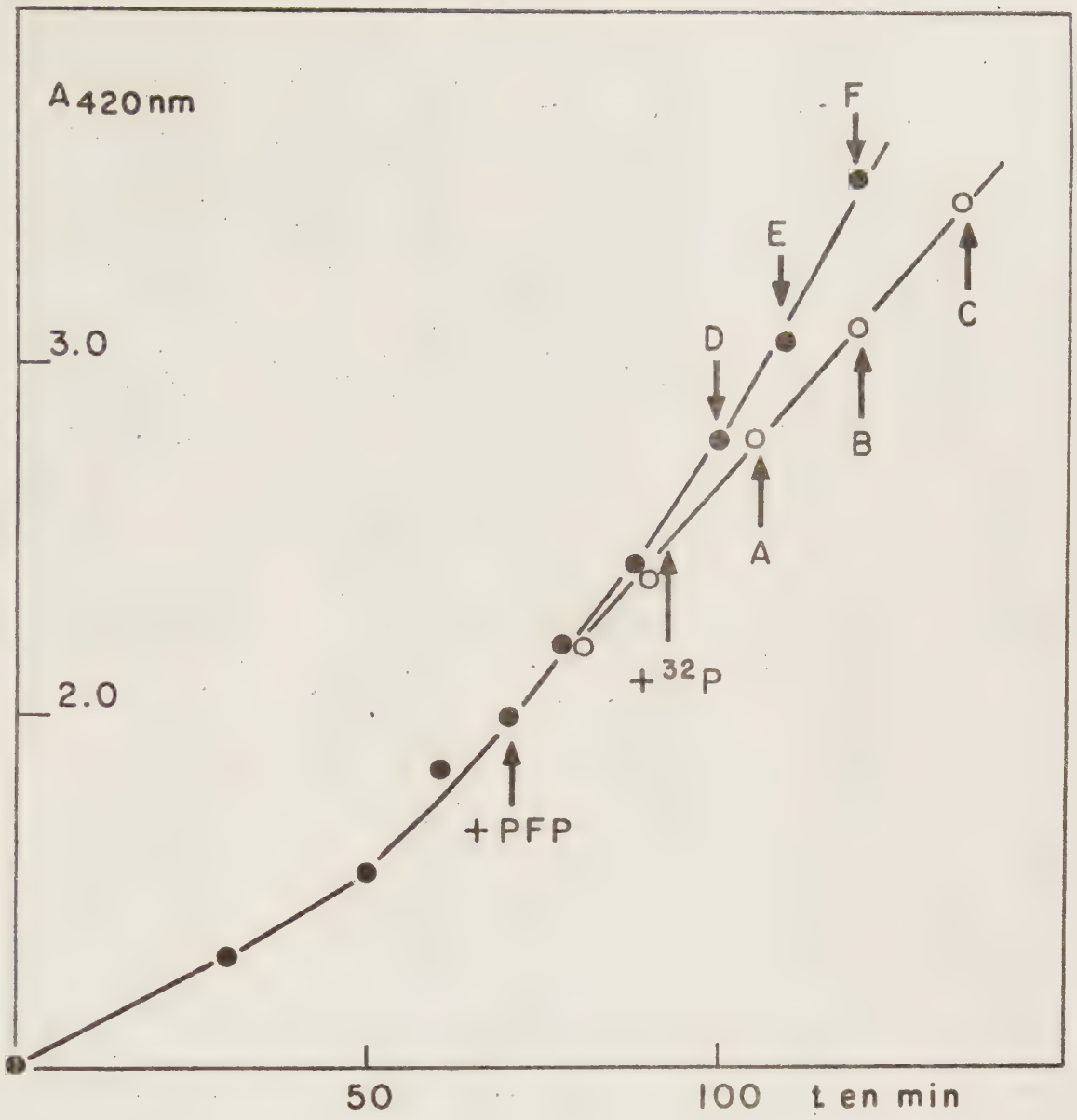


Figure 1 : EFFET DE LA PFP SUR LA CROISSANCE D'ESCHERICHIA COLI ML 308

L'addition de ^{32}P - PO_4HNa_2 à la culture témoin (●——●) et à la culture contenant de la PFP 10^{-3}M (O——O) a lieu après 20 minutes d'incubation en présence de l'analogue dans la culture traitée.

Les flèches A, B, C, D, E et F indiquent les moments de prélèvements des fractions aliquotes des deux cultures. L'analyse des extraits bactériens réalisés à partir des cellules contenues dans ces fractions est présentée dans la figure 2. Les récoltes A, B et C, bactéries cultivées en présence de PFP, sont faites respectivement 15, 30 et 45 minutes après l'addition du ^{32}P - PO_4HNa_2.

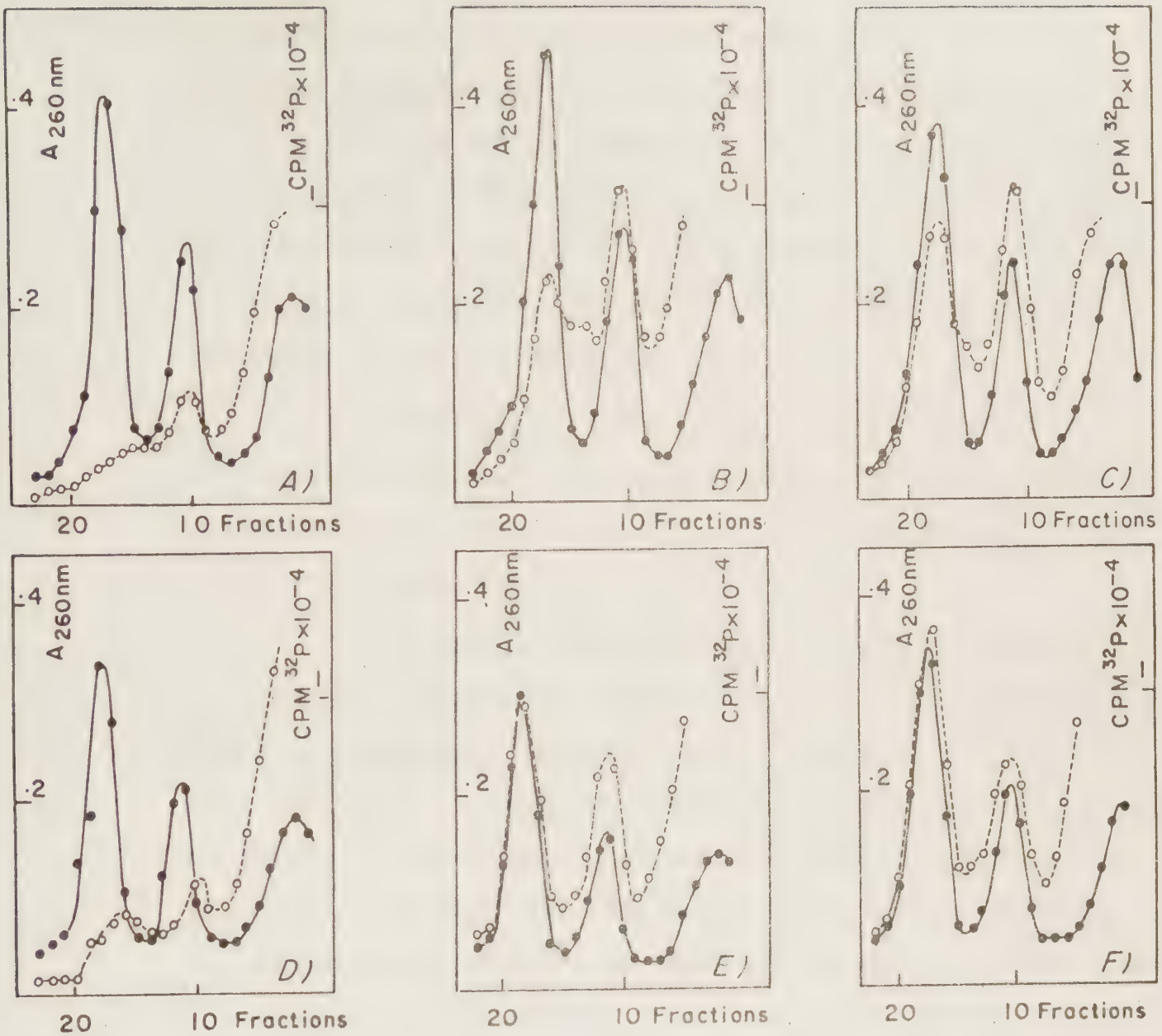


Figure 2: EFFET DE LA PFP SUR LA FORMATION DES RIBOSOMES

Des cellules prélevées, aux temps indiqués à la figure 1 , sur des cultures contenant de la PFP 10^{-3}M (A,B,C) ou en crpissance exponentielle (D,E,F) ont été ouvertes dans un tampon contenant $MgCl_2$ 10^{-4}M. Les extraits ont été analysés aprés une centrifugation de 15 heures à 20.000t/min. sur un gradient de saccharose 5-20 %. La sédimentation est faite à l'aide d'un rotor SW 25-1 dans une Spinco 1. ●——● Densité optique à 260 nm. 0----0 Radioactivité TCA précipitable à froid

de magnésium ($Cl_2Mg\ 10^{-2}M$), on remarque qu'une importante quantité de particules de coefficient de sédimentation 30 S et 50 S ne forme pas de monosomes (fig. 3B). Il semble donc que l'addition de PFP favorise l'accumulation principalement de trois types de particules ribonucléoprotéiques : les particules 43 S, les particules 30 S et 50 S incapables de s'associer pour donner des monosomes.

La présence de produits 50 S dans les extraits cellulaires réalisés à haut magnésium pourrait résulter de la modification des particules 43 S sous l'effet direct ou indirect de la concentration en magnésium.

Pour tester cette hypothèse, nous avons dialysé des particules 43 S isolées à partir d'extraits cellulaires réalisés à bas magnésium contre un tampon contenant $10^{-2}M\ Cl_2\ Mg$, puis les avons à nouveau analysées sur gradient de saccharose. La figure 3C révèle qu'à haut magnésium les particules 43 S forment des agrégats qui sédimentent au-delà des monosomes. L'estimation quantitative confirme ce résultat. D'autres expériences nous ont permis de vérifier par ailleurs que les particules 50 S non associées en monosome en haut magnésium conservent leur propriété de sédimentation après dialyse contre un tampon contenant $Cl_2Mg\ 10^{-4}M$.

3. - STABILITE DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES DES CELLULES TRAITEES A LA PFP

Le dinitrophénol (DNP) ajouté à une culture bactérienne en croissance a pour effet non seulement d'inhiber la synthèse des acides nucléiques, mais aussi de dégrader les

Figure 3 : PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES ACCUMULEES EN PRESENCE DE PFP

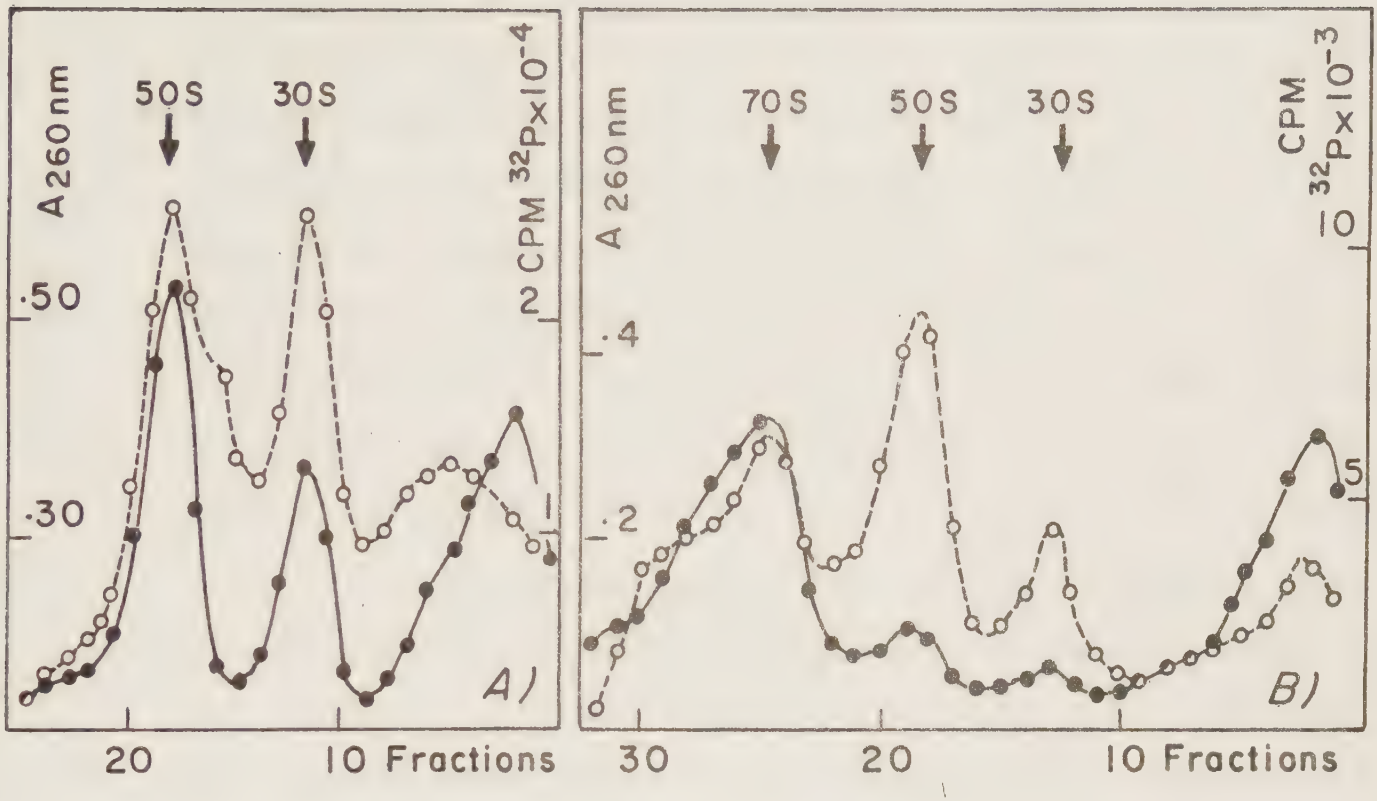
Des cellules cultivées en présence de PFP dans les conditions de la figure 1 et récoltées après 30 minutes de marquage au ^{32}P - PO_4 HNa_2 (7,5mCi/l) ont été lavées puis ouvertes dans un tampon contenant, soit du Cl_2Mg $10^{-4}M$ (fig. 3A), soit du Cl_2 Mg $10^{-2}M$ (fig. 3B) et analysées sur gradient de saccharose. L'extrait A a été centrifugé 15 heures à 20.000 t/min. L'extrait B, 15 heures à 19.000 t/min. à l'aide d'un rotor SW 25-1.

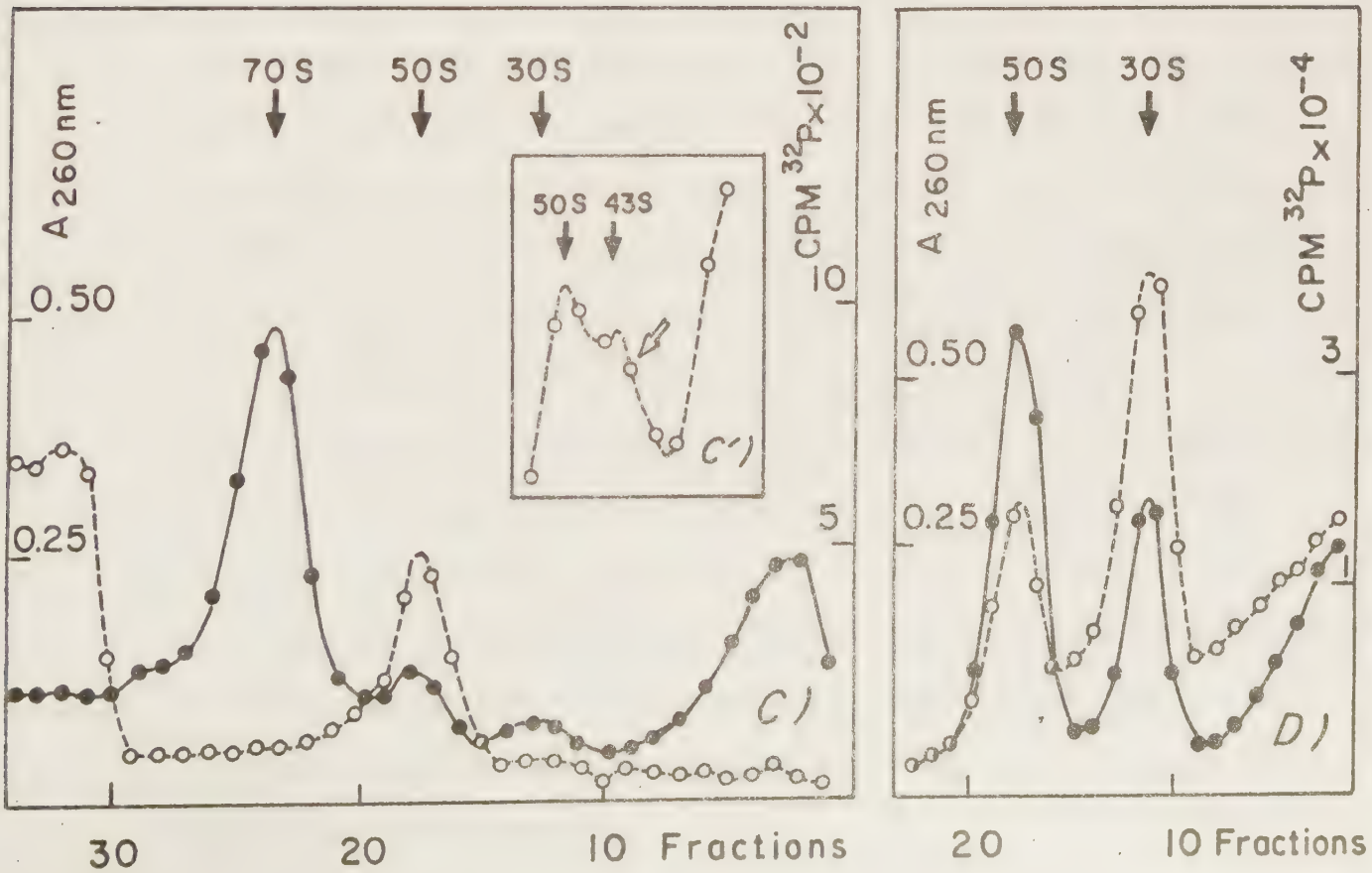
Une fraction d'un extrait cellulaire identique à la figure 3A a été isolée (comme l'indique la flèche de la figure 3C). Additionnée d'un extrait préparé avec le même tampon (Tris HCl $5.10^{-3}M$ pH 7.4, $MgCl_2$ $10^{-4}M$) de cellules traitées 50 minutes par la PFP, mais non marquées, cette fraction a été dialysée 3 heures contre un tampon contenant $MgCl_2$ $10^{-2}M$. Après dialyse, ce mélange a été centrifugé dans les conditions identiques à celles décrites dans la figure 3B. Le résultat de l'analyse est présenté dans la figure 3C.

La figure 3D représente un extrait réalisé dans un tampon contenant Cl_2Mg $10^{-4}M$ de cellules traitées à la PFP et marquées au ^{32}P - PO_4 HNa_2, dans les mêmes conditions que les bactéries analysées dans la figure 3A, mais dont on a prolongé l'incubation pendant 90 minutes en présence de DNP $5.10^{-3}M$ pH 7.5 avant leur récolte. Le DNP a été dissout dans le tampon Tris HCl 0,1 M pH 7.5.

●——● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité ^{32}P TCA insoluble à froid.


A260nm
50S
30S
.50
.30
2 CPM 32P x 10-4
A)
20
10 Fractions
70S
50S
30S
.4
.2
CPM 32P x 10-3
10
5
B)
30
20
10 Fractions


A260nm
70S
50S
30S
0.50
0.25
CPM 32P x 10-2
10
5
50S 43S
C')
C)
30
20
10 Fractions
A260nm
50S
30S
0.50
0.25
CPM 32P x 10-4
3
1
D)
20
10 Fractions

formes instables des RNA (83).

Nous avons observé que l'addition pendant 90 minutes de DNP 5 x 10^{-3}M à des cellules traitées à la PFP provoque une dégradation d'environ 30 % des produits acido insolubles préalablement synthétisés au cours d'un marquage au ^{32}P - PO_4 HNa_2. L'analyse des extraits de cellules ainsi traitées révèle une disparition des particules 43 S (fig. 3D), alors que les sous-unités 30 S ne sont pas détruites, les sous-unités 50 S ne l'étant que partiellement. Nous avons vérifié au cours d'autres expériences que les particules 30 S et 50 S incapables de s'associer en monosomes sont insensibles à l'action du DNP (fig.4A).

Le traitement <u>in vitro</u> des extraits bactériens, par la ribonucléase dans des conditions qui n'affectent pas les sous-unités 30 S et 50 S issues des polysomes (84), mais dégradent les éléments de nature ribonucloéprotéiques précurseurs des ribosomes, révèle que les particules 30 S et 50 S décrites plus haut (fig. 3B) accumulées par des cellules incubées en présence de DNP sont détruites par l'enzyme (fig. 4B). D'autres expériences nous ont permis de montrer que les particules 43 S étaient aussi sensibles à cette action de la ribonucléase. Ces produits 30 S et 50 S qui ne sont pas affectés par la présence du DNP <u>in vivo</u>, mais qui sont dégradés par action ménagée de la ribonucléase peuvent être assimilés aux particules observées par L. Gierer et A. Gierer (20) à l'issue d'un marquage rapide des cellules en croissance exponentielle. Ces particules étaient, elles aussi, sensibles à la ribonucléase et n'étaient pas associées en présence de concentration élevée en magnésium (10^{-2}M). Cette analogie semble accréditer l'hypothèse qui confère à la PFP la propriété de ralentir la cinétique de formation de ribosomes.

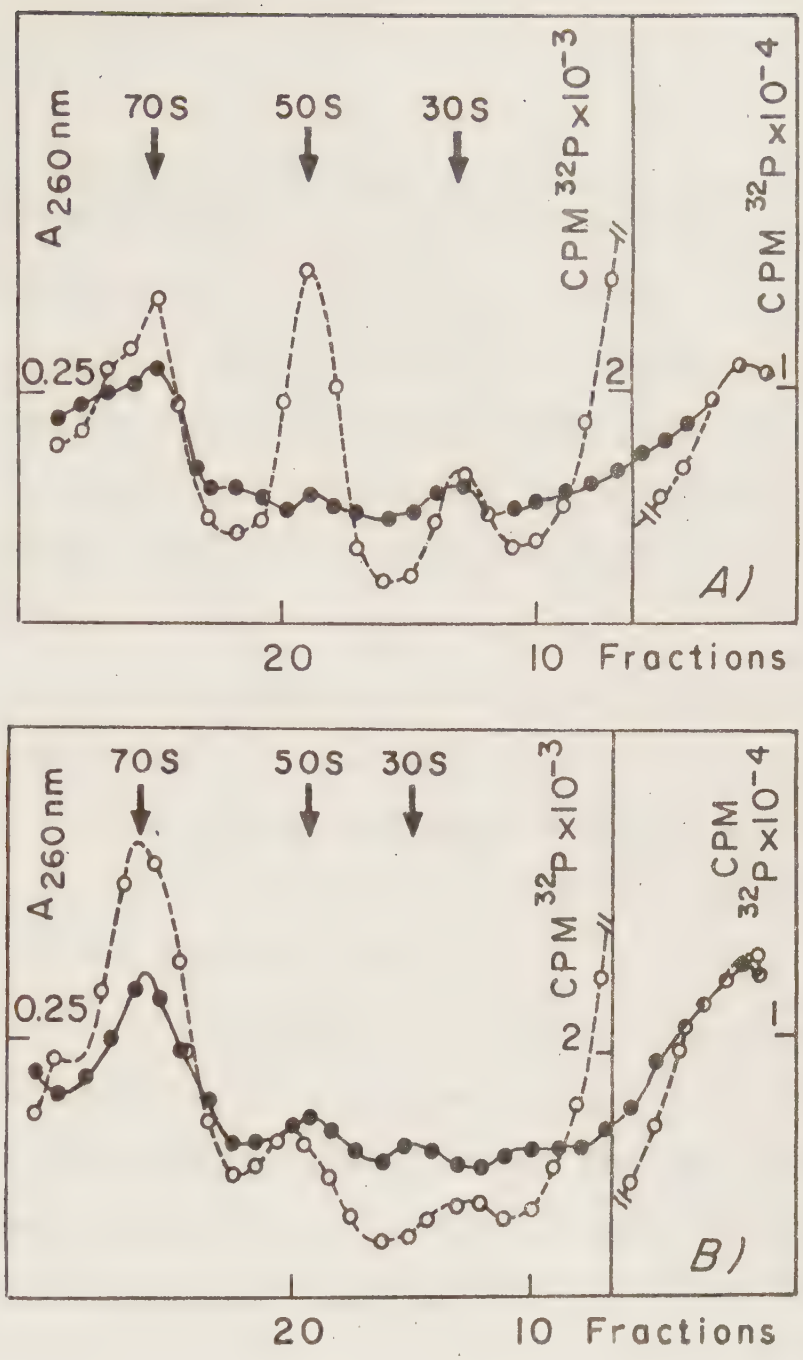


Figure 4 : ACTION DE LA RIBONUCLEASE SUR LES PARTICULES 30 S ET 50 S ACCUMULEES EN PRESENCE DE PFP

Une fraction aliquote d'un extrait cellulaire préparé dans un tampon contenant du Cl_2Mg 10^{-2}M est incubée en présence de ribonucléase pancréatique (EC.2.7.7.16) obtenue de Worthington. Cette incubation est réalisée à 20° C pendant 20 minutes, la concentration finale de l'enzyme est de 10 mg/ml. L'échantillon ainsi traité est ramené à 4° C, puis immédiatement soumis à une centrifugation de 19.000 t/min. pendant 15 heures.

A - Analyse de l'extrait non traité par l'enzyme.

B - Analyse de l'extrait incubé en présence de ribonucléase.

●——● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité ^{32}P du matériel TCA insoluble à froid.

4. - NATURE DES RNA RIBOSOMIQUES SYNTHETISES EN PRESENCE DE PFP

On sait que les précurseurs des RNA ribosomiques ont des comportements chromatographiques sur colonne de sérum albumine méthylée des mobilités électrophorétiques, et des coefficients de sédimentation sur gradient de saccharose qui diffèrent de ceux des RNA présents dans les sous-unités actives (85, 86, 87).

L'analyse des RNA obtenus après déprotéinisation d'un extrait brut de cellules marquées au ^{32}P - PO_4 HNa_2 en présence de PFP montre que leur comportement chromatographique sur colonne de MAK est comparable à celui des RNA présents dans des bactéries non traitées (fig. 5).

Nous avons confirmé ce résultat par analyse des RNA 16 S sur gradient de saccharose. Par ailleurs, nous avons utilisé ces deux techniques pour l'étude des RNA obtenus à partir de particules 43 S, 30 S et 50 S préalablement isolées sur gradient de saccharose. Les particules 43 S et 50 S contiennent un RNA 5 S et 23 S en quantité stoechiométrique. Les particules 30 S renferment un RNA 16 S. Ces RNA ont des propriétés chromatographiques et des coefficients de sédimentation semblables à ceux des RNA extraits de ribosomes biologiquement actifs.

5. - EVOLUTION DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES DES CELLULES TRAITEES A LA PFP

Mangiarotti et Schlessinger (88) ont montré que seules les sous-unités 30 S et 50 S qui participaient à la

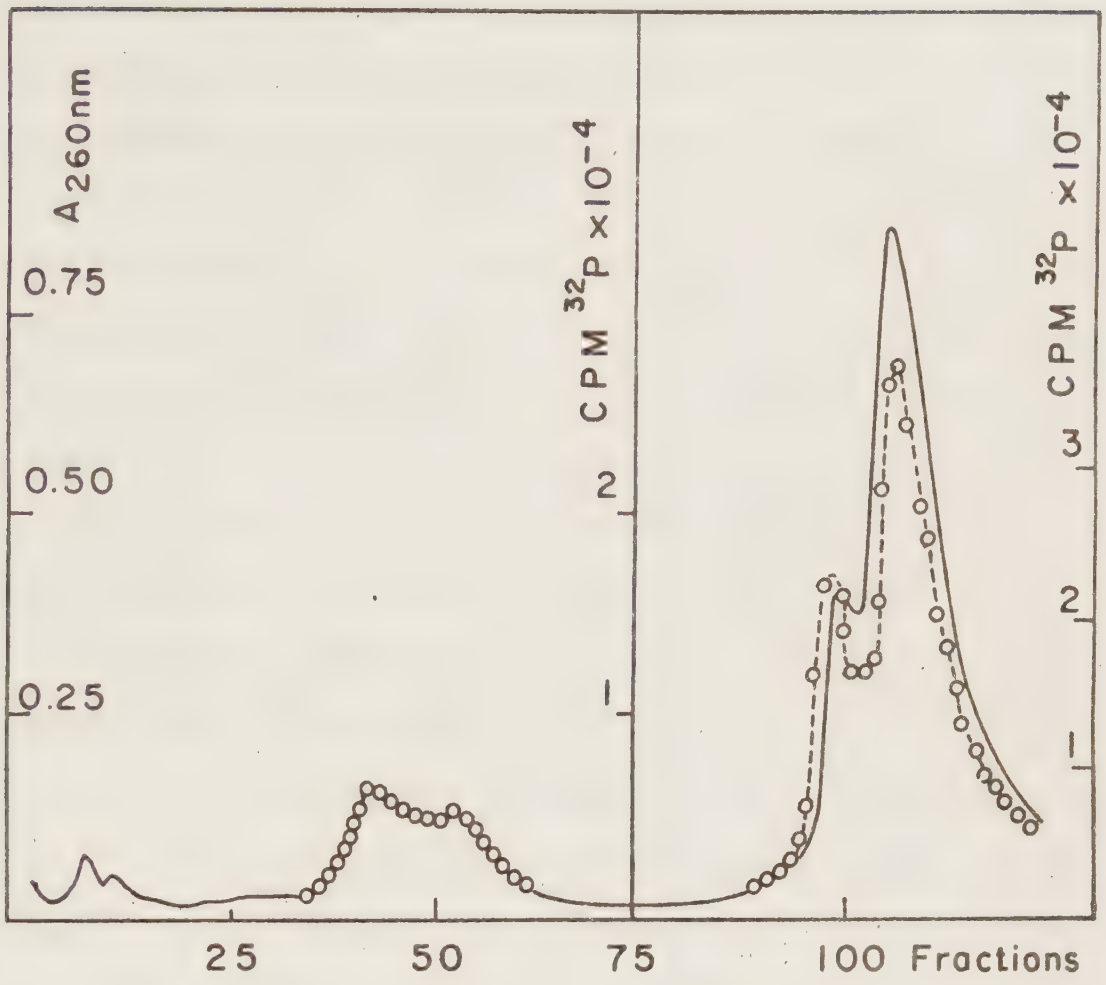


Figure 5 : PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES RNA SYNTHETISES EN PRESENCE DE PFP

Une fraction aliquote de l'extrait cellulaire analysé dans la figure 3A a été déprotéinisée selon la technique décrite par J. Marcot, Queiroz et R. Monier (55). Les RNA_s ainsi obtenus ont été analysés sur colonne de Kieselghur, imprégné de sérum albumine méthylée (81) après addition d'un RNA total entraîneur préparé à partir de cellules exponentielles normales.

——— Densité optique à 260 nm.

-o--o--o- Radioactivité contenue dans les produits acido-insolubles à froid.

biosynthèse des protéines au moment de la récolte des cellules, se révèlent être associées en monosomes dans les conditions de préparation de leurs extraits formés en présence de $MgCl_2$ 10^{-2}M. La formation de particules non fonctionnelles 43 S, 30 S et 50 S dans des cellules traitées à PFP peut, soit résulter de l'accumulation de produits anormaux incapables de participer à la synthèse protéique, soit traduire le ralentissement du processus de biosynthèse des ribosomes, soit indiquer enfin que les particules 30 S et 50 S ainsi formées, interviennent dans la synthèse protéique avec une efficacité inférieure à celle des sous-unités 30 S et 50 S présentes dans les cellules avant l'addition de l'analogue. Dans cette dernière situation, ces particules constitueraient alors un pool de sous-unités natives.

L'observation préliminaire selon laquelle un marquage au ^{32}P - PO_4 HNa_2 de 175 minutes en présence de l'analogue ne permet plus de déceler une accumulation de produits 43 S, 30 S et 50 S, semblait écarter la première et la troisième hypothèse. Nous avons pu vérifier que l'on assistait en fait à un ralentissement du processus de biosynthèse des ribosomes en réalisant plusieurs expériences de chasse de précurseurs marqués des RNA (^{14}C Uracile) ou de l'analogue (^{14}C PFP).

Si on incube pendant 30 minutes en présence de ^{14}C Uracile une culture de Escherichia coli, préalablement traitée par la PFP, l'élimination par lavage du marqueur radioactif suivie d'une incubation prolongée de 60 minutes en présence de l'analogue, permet d'observer que dès les 10 premières minutes de chassage, la radioactivité acido-insoluble diminue d'environ 10 %, puis reste constante pendant toute la durée de l'expérience. L'analyse sur gradient de saccharose d'extraits

bactériens dès la fin du lavage et 60 minutes après la remise en suspension des cellules dans le milieu dépourvu de marqueur montre que les RNA contenus dans les particules 30 S et 50 S présentes dans le premier extrait (fig. 6A), se retrouvent au niveau des monosomes dans le second (fig. 6B).

La quantité de produits marqués TCA précipitables situés au niveau des ribosomes et des sous-unités est identique dans les deux gradients : 12 075 CPM (fig. 6A) et 12 012 CPM (fig. 6B). Par ailleurs, si le chassage a lieu en absence de l'analogue, on observe aussi un transfert des formes 30 S et 50 S vers les monosomes 70 S et ce, avec la même efficacité (tableau I). De plus, dans ce cas, la cinétique de la croissance retrouve les caractéristiques de cellules en phase exponentielle.

Les RNA ribosomiques formés en présence de PFP participent donc à la biosynthèse de ribosomes biologiquement actifs.

Dès lors, nous avons étudié le comportement des protéines ribosomiques contenant l'analogue et associées aux particules 43 S, 30 S et 50 S. Nous avons suivi un protocole expérimental analogue à celui que nous avons utilisé dans l'étude de l'évolution des RNA en substituant la ^{14}C PFP au ^{14}C Uracile. Le chassage a été effectué en présence de ^{12}C phénylalanine. Dans ces conditions, la radioactivité acido-insoluble à chaud diminue environ de 7 % au cours des vingt premières minutes qui suivent l'élimination du marqueur, période nécessaire à l'accélération de la croissance bactérienne.

L'analyse sur gradient de saccharose d'extraits bactériens préparés dans un tampon contenant 10^{-4}M de Cl_2Mg à

Figure 6 : DESTIN DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES SYNTHETISEES EN PRESENCE DE PFP

Une culture ayant atteint une densité optique à 420 nm égale à 2.00 est incubée en présence de PFP (concentration finale 10^{-3}M). Après 20 minutes d'incubation, on a ajouté du ^{14}C Uracile (1,06mCi/mmole - 0,033mCi/L). La culture a été filtrée après 30 minutes en présence du marqueur radioactif et les cellules ont été resuspendues dans un milieu contenant 10^{-3}M de ^{12}C Uracile et de 10^{-3}M de PFP.

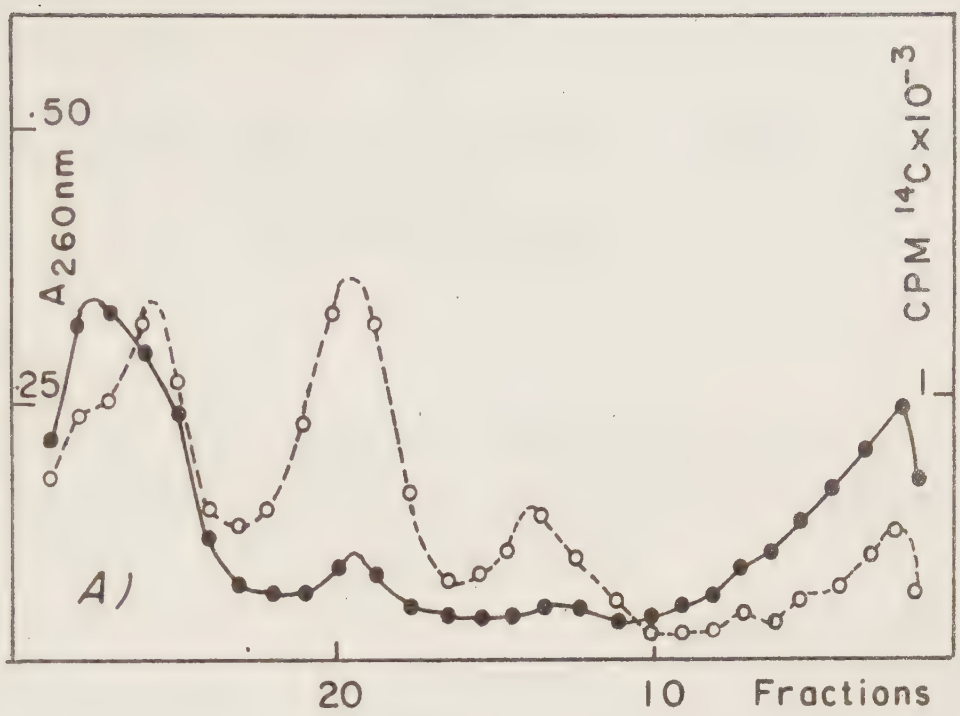
Un aliquot des bactéries marquées par le ^{14}C Uracile a été prélevé aussitôt après filtration. Un second aliquot a été récolté après 60 minutes d'incubation en présence de PFP et de ^{12}C Uracile. Les deux aliquots ont été extraits dans un tampon renfermant 10^{-2}M de $MgCl_2$ sans addition de cellules entraîneuses. Les extraits cellulaires ont été analysés sur des gradients de saccharose 5 - 20 % préparés dans le même tampon à 4° C.

A - Analyse de l'aliquot prélevé après filtration.

B - Analyse de l'aliquot prélevé après 60 minutes d'incubation en présence de PFP et de ^{12}C Uracile.

—●—●—●— Densité optique à 260 nm.

—O—O—O— ^{14}C Uracile présent dans les produits TCA insolubles à froid.


.50
A260nm
.25
CPM 14C x10-3
A)
20
10
Fractions

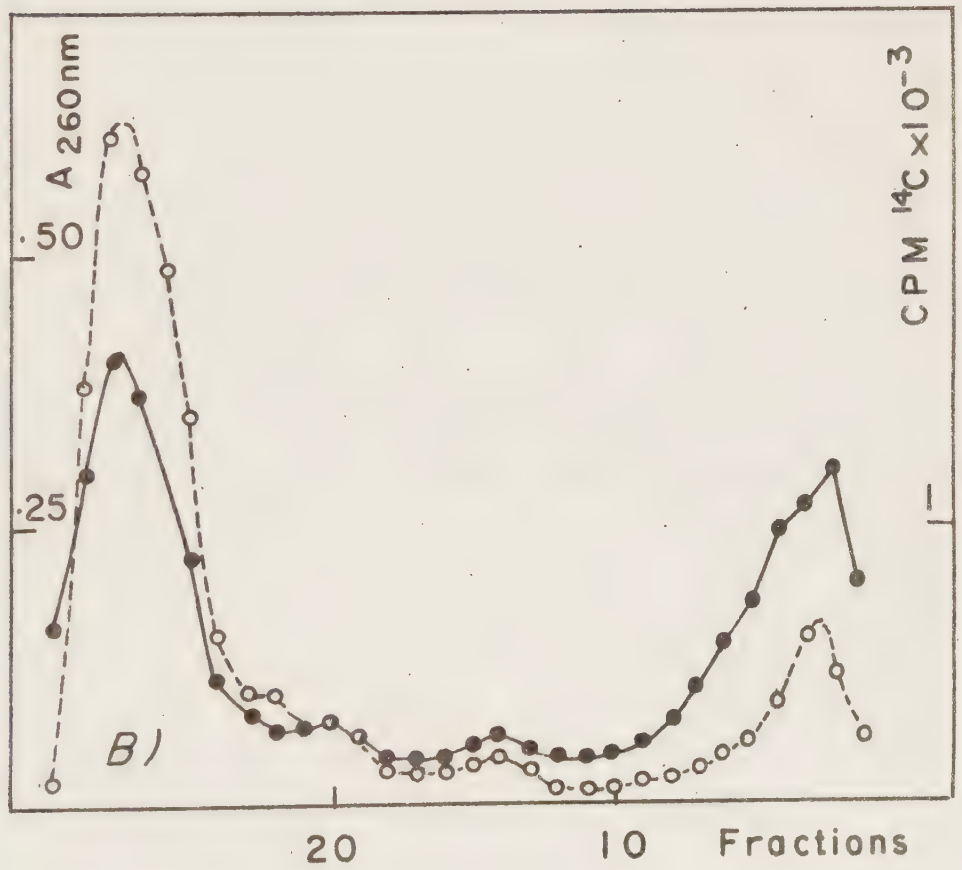

A260nm
.50
.25
CPM 14C x10-3
B)
20
10
Fractions

TABLEAU I

EVOLUTION DES RNA LIES AUX PARTICULES 30 S ET 50 S ACCUMULES EN PRESENCE DE PFP

Particules	Radioactivité incorporée dans les RNA ribosomiques (% des $_r$RNA totaux)		
	Avant chassage	Après chassage en présence de PFP	Après chassage en absence de PFP
30 S	11	4	6
50 S	35	5	8
70 S	40	81	83

Les conditions sont celles décrites dans la figure 6.

partir de cellules récoltées, soit immédiatement après l'élimination de la ^{14}C PFP du milieu de culture, soit après 60 minutes de chassage en présence de ^{12}C phénylalanine, nous conduit à formuler trois remarques (voir tableau II).

1 - Les particules 43 S présentes dans les extraits de cellules récoltées avant le chassage disparaissent après celui-ci.

2 - La radioactivité acido-insoluble à chaud diminue, après 60 minutes d'incubation en présence de ^{12}C phénylalanine dans les fractions contenant les protéines solubles.

3 - Dans les mêmes conditions, la radioactivité liée aux particules ribosomiques ne décroit pas.

La formation de ribosomes fonctionnels à partir de particules ribosomiques contenant dans sa fraction protéique de la PFP se fait donc sans déplacement de celle-ci.

L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la PFP provoque un ralentissement du processus de biogénèse des ribosomes.

TABLEAU II

EVOLUTION DES PROTEINES CONTENANT DE LA PFP

	Avant chassage (CPM)	Après chassage (CPM)
Protéines solubles	1954	1281
Sous-unités 30 S	- (1)	335
Sous-unités 50 S	- (1)	146
Total des ribosomes	907	1081

(1) La séparation des produits 30 S, 43 S et 50 S est insuffisante pour permettre une évaluation correcte de la radioactivité associée à chacune de ces particules.

A une culture ayant atteint une densité optique à 420 nm égale à 2,00, on a ajouté de la ^{14}C PFP (3,5 ml/mmole, 1,25 mC/l) et du ^{12}C Uracile ($5.\ 10^{-5}M$). Après 50 minutes, la culture a été filtrée et les cellules ont été resuspendues dans un milieu renfermant de la ^{12}C-L-phénylalanine ($10^{-3}M$) et du ^{12}C Uracile ($10^{-3}M$). Un premier aliquot a été récolté dès la remise en suspension, un second aliquot a été prélevé 60 minutes après incubation en présence de la ^{12}C-phénylalanine. Les extraits cellulaires correspondant à ces prélèvements ont été réalisés dans un tampon contenant $10^{-4}M$ de Cl_2Mg et analysés sur gradients de saccharose. La radioactivité acido-insoluble a été déterminée pour chacune des fractions du gradient.

II - EFFETS DE LA CARENCE EN PHOSPHORE SUR LA FORMATION DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES ACCUMULEES EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE

Nous avons rappelé dans l'introduction à ce chapitre que l'arrêt de la synthèse protéique résultant d'une carence en un acide aminé chez une souche d'Escherichia coli Rel A^- ou provoqué par l'addition de chloramphénicol à des bactéries de génotype Rel A^+ ou Rel A^- ne bloque pas la transcription des RNA ribosomiques. Dans ces conditions, la biosynthèse des ribosomes s'arrête dès lors que le pool de protéines ribosomiques libres présents dans la cellule au moment de l'arrêt de la croissance, se trouve épuisé. Selon Schleif, ce pool est très réduit chez les cellules en croissance exponentielle, il est inférieur à 5 % des protéines ribosomiques totales (4,89), ce qui, en absence de synthèse protéique, permet la formation d'un nombre réduit de ribosomes (90).

Cependant, des bactéries soumises à une carence en phosphate induisent la dégradation des RNA constitutifs de leurs sous-unités ribosomiques et libèrent ainsi des protéines de l'organite permettant à la cellule d'accroître sa capacité à former des particules 30 S et 50 S en absence de synthèse protéique active (73). Une telle situation, parce qu'elle permet la formation de sous-unités ribosomiques à partir de

protéines synthétisées au cours de la croissance exponentielle, et de RNA transcrit postérieurement à l'arrêt de cette croissance est très favorable à l'étude *in vivo* des interactions entre ces deux types de constituants.

1 - PROPRIETES DES PARTICULES 30 S ET 50 S SYNTHETISEES EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL.

Un extrait cellulaire obtenu à partir de bactéries carencées en phosphate pendant 60 minutes, puis restaurées avec du $^{32}P\text{-}PO_4Na_2$ en présence de chloramphénicol contient une quantité importante de produits acido-insolubles à froid qui sédimentent entre 18 S et 50 S (73), (fig. 7a). La même analyse faite sur des extraits provenant de bactéries qui n'ont pas subi une carence en phosphate avant l'addition de l'antibiotique et du marqueur, ne permet de déceler que des composés ribonucléoprotéiques 18 S et 25 S (27,28). Nous avons discuté au cours de l'introduction de la signification de ces derniers composés appelés particules chloramphénicol.

In vitro, l'action ménagée de la ribonucléase sur des extraits de bactéries préalablement carencées en phosphore, si elle détruit la presque totalité des particules de faible coefficient de sédimentation formées en présence de chloramphénicol au cours de la restauration en phosphore (fig. 7b), n'affecte pas les produits 30 S et 50 S synthétisées dans les mêmes conditions.

Par ailleurs, ces particules 30 S et 50 S sont résistantes à l'action *in vivo* du dinitrophénol : dans des conditions

Figure 7 : RESISTANCE A LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE DES PARTICULES 30 S ET 50 S FORMEES EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL

Des cellules de Escherichia coli ML 308 ont été cultivées sur milieu 68 contenant 0,5 mM de phosphore (80). Dans ces conditions, dès que la culture atteint une densité optique proche de 5 unités mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jean et Constant, le milieu devient limitant en phosphore.

Après une heure de carence en phosphore, celui-ci est ajouté à une concentration de 0,5 mM en présence de $^{32}P - PO_4HNa_2$ et de 100 µg/ml de chloramphénicol. 15 minutes plus tard, les cellules sont récoltées, puis remises en suspension dans un tampon Tris HCl 5 mM pH 7.4 $MgCl_2$ 0.1 mM en présence de déoxyribonucléase pancréatique purifiées EC 3.1.4.5. (Worthington) à raison de 50 µg d'enzyme/g de cellules. Les bactéries sont alors ouvertes par une pression de 7.000 lb/in^2 à l'aide d'une French Press Cell (Aminco). Les débris cellulaires et les bactéries entières sont éliminés au cours d'une centrifugation à 15.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est réparti en deux aliquots incubés 20 minutes à 20° C, l'un contenant 10 µg/ml de ribonucléase pancréatique (Worthington), puis refroidi à 4° C. Ces surnageants sont analysés sur gradient de saccharose 5 - 20 % dans un tampon utilisé pour l'extraction, après une centrifugation de 15 heures à 20.000 t/minute dans un rotor Spinco SW 25-1.

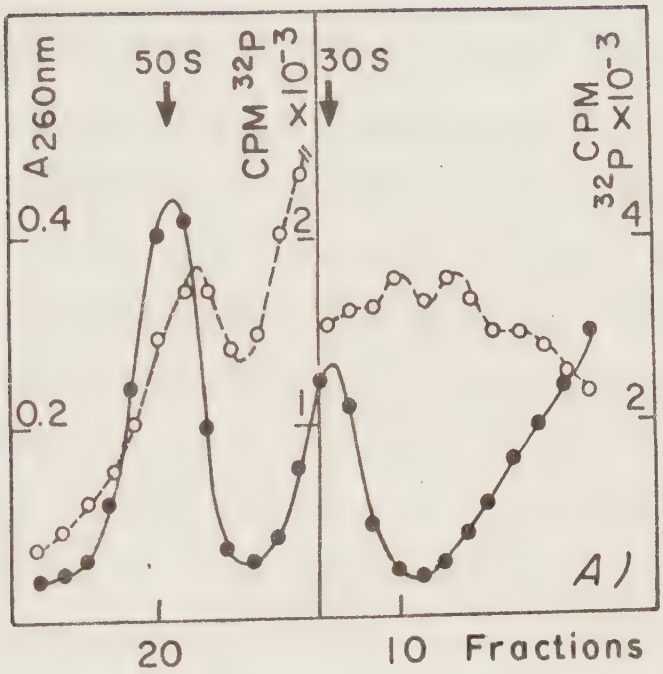
Pour chaque fraction de gradient un aliquot de 0,4 ml est dilué dans 10 ml de solution de Bray (91) et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard. Un second aliquot de 0,4 ml est dilué avec 2,4 ml de NaCl 0.15 M afin de mesurer la densité optique à 260 nm.

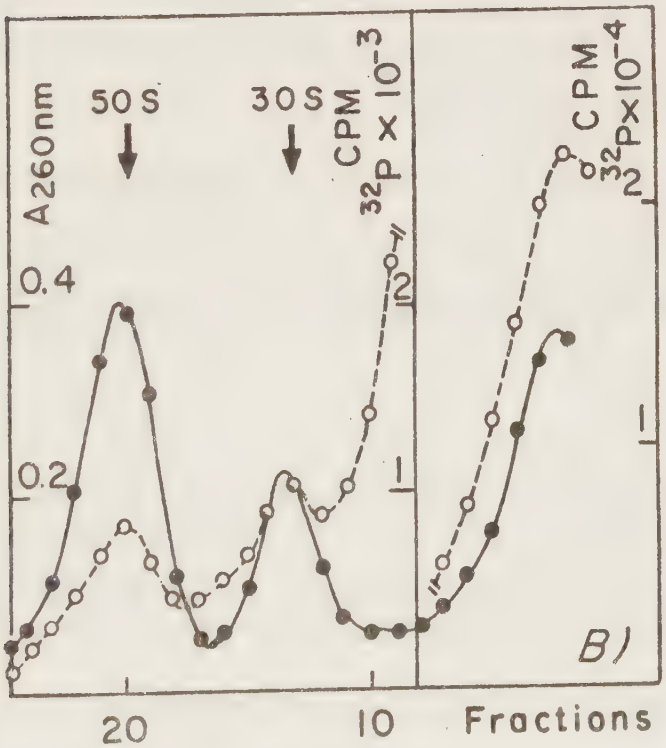
A - Extrait cellulaire non traité par la ribonucléase.

B - Extrait cellulaire traité par la ribonucléase.

●———● Densité optique à 260 nm.

O---O--- Radioactivité.


A260nm
50S
30S
CPM 32P x10-3
32P CPM x10-3
0.4
0.2
2
1
4
2
A1
20
10 Fractions


A260nm
50S
30S
CPM 32P x 10-3
32P CPM x10-4
0.4
0.2
2
1
2
1
B1
20
10 Fractions

où le DNP induit la dégradation de 50 % des produits acido-insolubles marquées au ^{32}P - $PO_4 HNa_2$ et fabriqués en présence de chloramphénicol au cours d'une restauration en phosphore (fig. 8), les composés 30 S et 50 S sont stables (fig. 9B).

En étudiant la dégradation des ribosomes de cellules en croissance exponentielle soumises à une carence en phosphore, J. Julien et Coll. (73) ont montré que cette dégradation était très rapide pendant la première heure de carence, puis se ralentissait. Nous avons estimé la capacité des cellules à former des particules 30 S et 50 S chloramphénicol après des temps différents de carence en phosphore (0 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min). Nous avons observé que cette capacité était maximale après 60 minutes de carence et diminuait par la suite (fig. 9 et tableau III). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse formulée par Julien et Coll. (73) selon laquelle cette capacité des bactéries carencées en phosphore à former des particules 30 S et 50 S en présence de chloramphénicol est dépendante de l'accumulation de protéines ribosomiques libres provenant de la dégradation des ribosomes préexistants.

2 - SYNTHESE DE PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES CHEZ LES SOUCHES BACTERIENNES Rel A$^-$ CARENCEES EN UN ACIDE AMINE

Nous savons que des cellules d'*Escherichia coli* porteuses du gène Rel A$^-$ accumulent des particules 18 S et 25 S au cours d'une carence en acide aminé. Selon notre hypothèse, l'accroissement du pool des protéines ribosomiques libres conséquent à une absence de source exogène de phosphore devrait permettre la formation de particules 30 S et 50 S chez

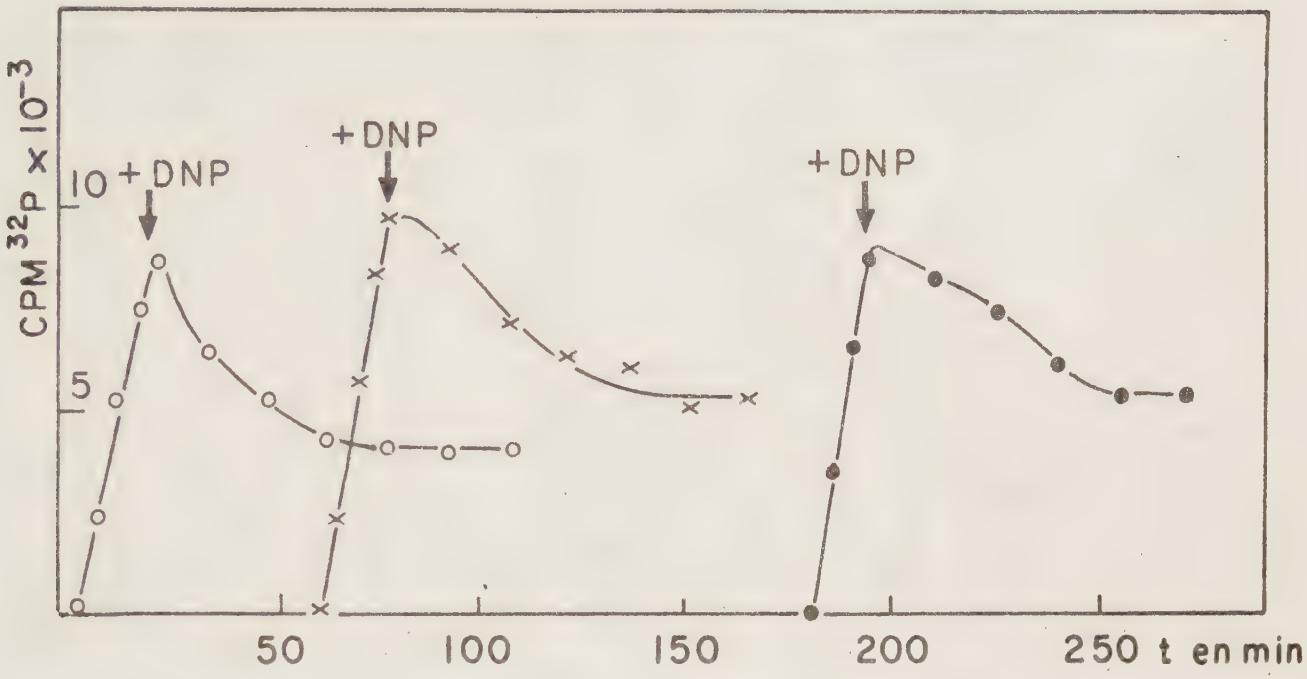


Figure 8 : ACTION DU DNP AU COURS DE LA CARENCE EN PHOSPHORE

A une culture carencée en phosphore dans les conditions décrites à la figure 7, on a ajouté, 15 minutes après une restauration en l'ion limitant en présence de ^{32}P - PO_4 HNa_2 et de 100 µg/ml de chloramphénicol, une solution de DNP pH 7.5 afin d'obtenir une concentration finale égale à 5 mM. La restauration a eu lieu sur trois aliquots de la culture aux temps 0, 1 heure et 3 heures de carence en phosphore. Des prélèvements de 0.2 ml ont été effectués, précipités dans du TCA 5 % à 4° C, puis filtrés sur disques millipores de 0,45 µ de diamètre afin de mesurer la radioactivité contenue dans les produits acido-insolubles à froid.

O——O——O Restauration au temps zéro de la carence en phosphore.

×——×——× Restauration après 1 heure de carence en phosphore.

●——●——● Restauration après 3 heures de carence en phosphore.

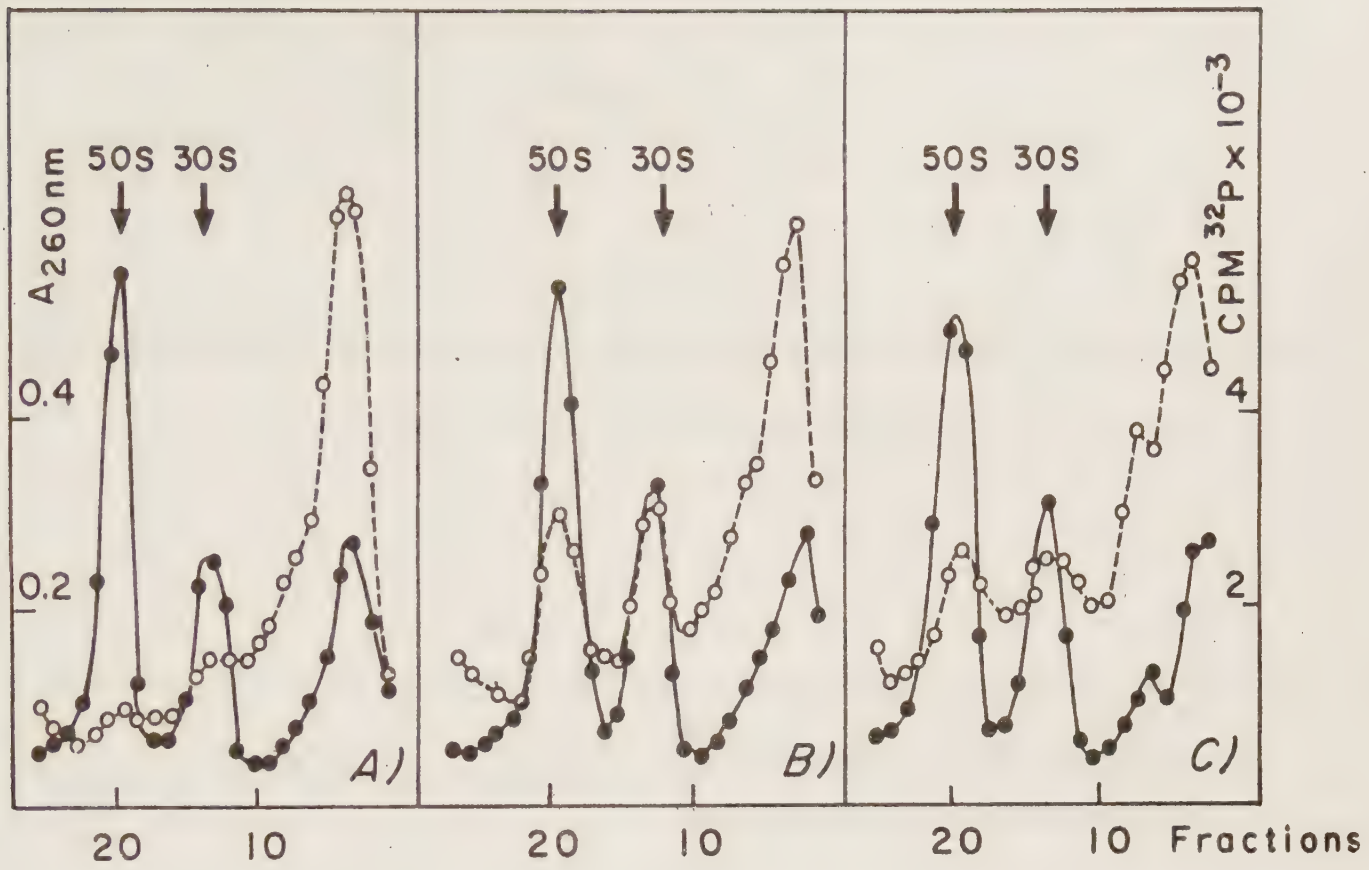


Figure 9 : CAPACITE DES CELLULES A FORMER DES PARTICULES 30 S ET 50 S EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL AU COURS DE LA CARENCE EN PHOSPHORE

Les cellules ont été marquées avec du ^{32}P - PO_4HNa_2 dans les conditions décrites à la figure 8, puis récoltées après 90 minutes de traitement au DNP 5 mM pH 7.5. Celui-ci a été ajouté après 15 minutes de restauration en phosphore.

Les extraits cellulaires ont été réalisés et analyses dans les conditions décrites figure 7A. Les figures A, B et C représentent l'analyse des extraits de bactéries traitées respectivement aux temps zéro, 1 heure et 3 heures de carence en phosphore.

●—●—● Densité optique à 260 nm.

O---O---O Radioactivité présente dans les produits acido-insolubles à 4° C.

TABLEAU III

PARTICULES 50 S FORMEES EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL EN FONCTION DE LA DUREE DE LA CARENCE EN PHOSPHORE

Durée de la carence en phosphore	Radioactivité spécifique des particules chloramphénicol 50 S
Min	CPM/Unité DO à 260 nm
0	2681
60	7336
180	6814

Les mesures ont été effectuées à partir de l'analyse sur gradient de saccharose d'extraits cellulaires identiques à ceux décrits dans la figure 9.

des cellules privées en leur acide aminé essentiel. En vérifiant cette hypothèse, nous avons été amenés à déterminer si la formation de particules ne pouvait être dépendante de la nature de l'acide aminé limitant. On sait, par exemple, qu'une carence en méthionine modifie in vivo la biogénèse des particules ribosomiques en provoquant une sous-méthylation des rRNA macromoléculaires (92). En effet, cet acide aminé participe aux modifications postranscriptionnelles des RNA ribosomiques en tant que donneur de groupements méthyls.

Pour notre étude, nous avons donc utilisé deux souches Rel A^- d'Escherichia coli; l'une auxotrophe pour l'arginine : la souche PA1; l'autre pour la méthionine : la souche EA2.

A - FORMATION DE PARTICULES 30 S ET 50 S AU COURS D'UNE CARENCE EN ARGININE.

Comme le font les bactéries ML 308, les cellules de la souche PA1 (Arg^-, $B1^-$, Rel A^-), cultivées sur milieu 68, sont carencées en phosphore dès lors que la culture atteint une densité optique à 420 nm proche de 4.5 unités mesurée au spectrophotomètre Jean et Constant. Nous avons pu déterminer qu'au cours de la carence en phosphore ce n'est que 20 minutes après l'élimination de l'arginine du milieu de culture que le taux de synthèse protéique tend à diminuer, alors que le ralentissement se produit au plus tard dans les 10 minutes si ce traitement est effectué sur des cellules en croissance exponentielle.

Nous avons déterminé les particules synthétisées au cours de la restauration en phosphore de cellules carencées en

arginine et privées de phosphore depuis 60 minutes (fig. 10A). De plus, nous avons traité des cellules ainsi restaurées en phosphore en présence de ^{32}P - PO_4 HNa_2, par du DNP 5 mM pH 7.5. Dans ces conditions, 30 % des produits acido-insolubles à froid marqués au ^{32}P sont détruits dans les 50 minutes qui suivent l'addition du DNP.

L'analyse des extraits de cellules ainsi traitées montre qu'en absence d'arginine les bactéries de la souche PA1 peuvent, dans les conditions particulières à la carence en phosphore, former in vivo des particules 30 S et 50 S résistantes à l'action du DNP (fig. 10B). Nous avons vérifié après avoir isolé les particules et les avoir dialysées en présence de ribosomes de cellules récoltées au cours de la croissance exponentielle que les produits ainsi formés présentaient un coefficient de sédimentation identique à celui des sous-unités normales (fig. 10C et 10D).

Les bactéries d'une souche Rel A^- carencée en un acide aminé tel que l'arginine synthétisent dans des particules 30 S et 50 S résistantes à l'action du DNP dès qu'elles ont subi une carence en phosphore préalablement à l'arrêt de son mécanisme de traduction.

B - SYNTHESE DE PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES PAR DES BACTERIES AUXOTROPHES POUR LA METHIONINE ET CARENCEES EN PHOSPHORE.

Dans nos conditions de culture, la souche EA2 (Met^-, $Biotine^-$, Rel A^-) croit de manière exponentielle dans le milieu 68 complémenté en biotine et méthionine pour atteindre une den-

Figure 10 : FORMATION DE PARTICULES 30 S ET 50 S PAR DES CELLULES DE LA SOUCHE PA 1 CARENCEES EN ARGININE

Des bactéries de la souche PA 1 (arg^-, $B1^-$, Rel A^-) ont été cultivées dans du milieu 68 contenant 0.4 % de glucose, 100 µg/ml de L-arginine et 0,34 µg/ml de vitamine B1. Dans ces conditions, les cellules sont carencées en phosphore dès lors que la culture a atteint 4.5 unités de densité optique à 420 nm mesurée à l'aide du spectrophotomètre Jean et Constant.

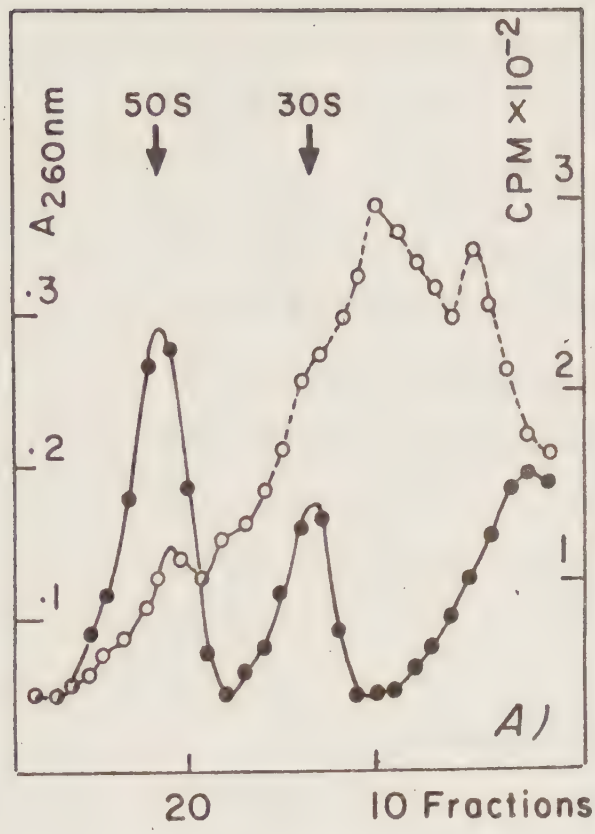
Après 20 minutes de carence en phosphore, on élimine l'arginine du milieu par filtration des bactéries sur disques millipore (pores de 0,45 µ). Ces cellules sont remises en suspension dans du milieu 68 glucose, vitamine B1, ne contenant ni arginine ni phosphore, puis filtrées à nouveau. Cette opération est reproduite deux fois et s'effectue à 30° C.

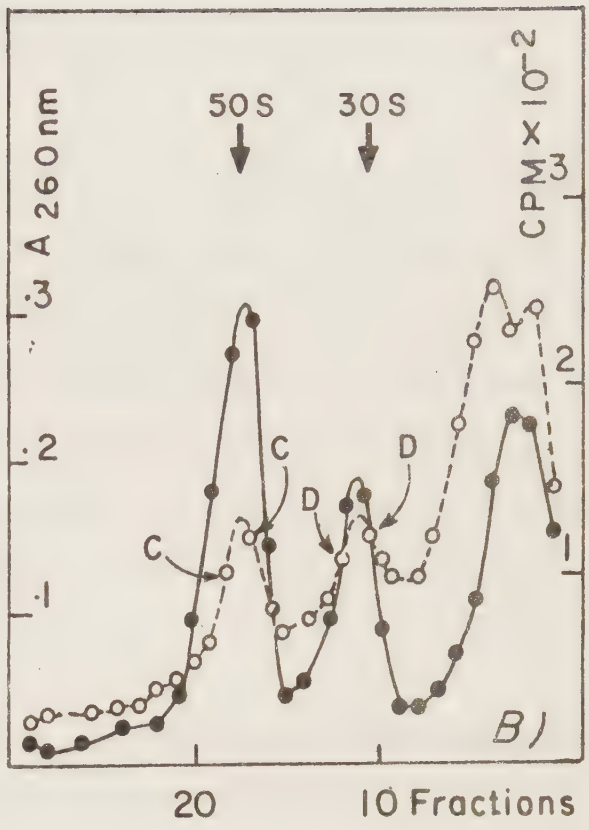
Les cellules sont remises en suspension et cultivées dans ce même milieu. 40 minutes plus tard, on ajoute du PO_4H_2K à une concentration finale 0.5 mM et du ^{32}P - PO_4HNa_2 (7.5 m Ci/l). Après 15 minutes de restauration en phosphore, la moitié de la culture est récoltée à 4° C, l'autre moitié est incubée pendant 90 minutes en présence de DNP 5 mM pH 7.5. Les deux aliquots cellulaires sont extraits et analysés dans les conditions décrites figure 7. La figure 10A représente la composition des cellules récoltées avant le traitement du DNP, la figure 10B montre les extraits des bactéries qui ont subi ce traitement.

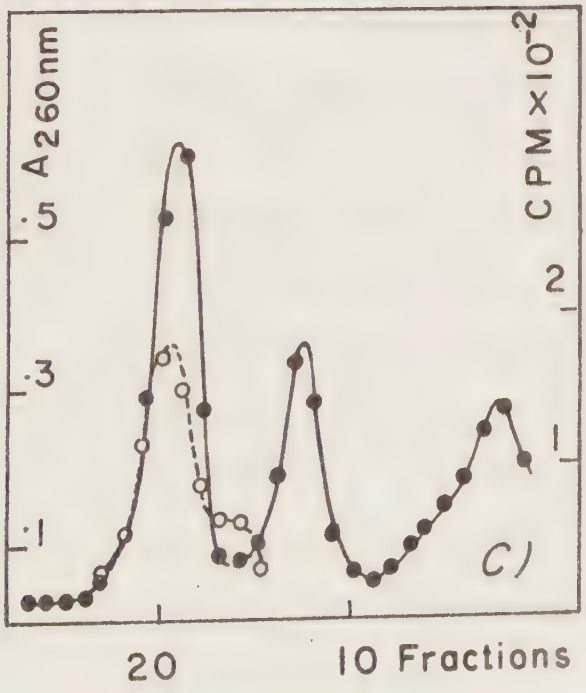
Les flèches C et D de la figure 10B indiquent les fractions qui ont été récoltées, puis dialysées 3 heures à 4° C contre un tampon Tris HCl 5 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 10^{-4}M en présence d'un extrait de cellules PA 1 non marquées et récoltées au cours de la croissance exponentielle. Les fractions C et D sont analysées à nouveau sur gradient de saccharose et représentent respectivement les particules 50 S et 30 S synthétisées pendant la carence en arginine au cours de la restauration en phosphore (fig. 10C et 10D).

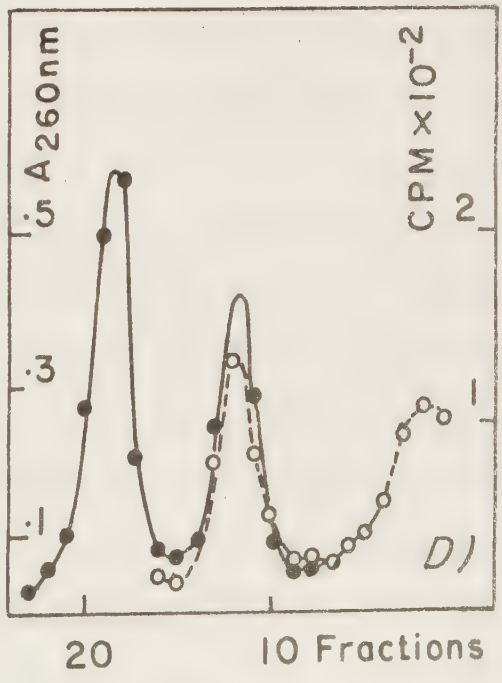
●—●—● Densité optique à 260 nm.

---○---○--- Produits marqués au ^{32}P et acido-insolubles à 4° C.


50S
30S
A260nm
CPM x 10⁻²
A)
20
10 Fractions


50S
30S
A 260nm
CPM x 10⁻²
C
D
B)
20
10 Fractions


A260nm
CPM x 10⁻²
C)
20
10 Fractions


A260nm
CPM x 10⁻²
D)
20
10 Fractions

sité optique à 420nm égale à 3.5 unités. A cette concentration cellulaire, les bactéries ont épuisé le phosphore du milieu (fig. 11).

De plus, après élimination de la méthionine du milieu de culture, le temps nécessaire à l'inhibition de la synthèse protéique due à la carence en l'acide aminé ainsi provoquée, est variable selon que l'on traite des cellules en cours de croissance exponentielle ou des cellules privées de phosphore. Dans le premier cas, 10 minutes suffisent pour observer l'arrêt de la traduction, dans le second 30 minutes sont nécessaires (fig. 12).

a) Capacité des cellules EA2 carencées en phosphore à former des particules ribonucléoprotéiques en absence de synthèse protéique.

L'augmentation du pool des protéines ribosomiques libres déterminée par la capacité qu'acquièrent les bactéries à former des particules 30 S et 50 S en absence de synthèse protéique est un phénomène général lié à la carence en phosphore et que nous avons étudié à l'aide des souches ML 308 et PA1. Nous avons vérifié que les bactéries de la souche EA2 présentaient, dans des conditions identiques, cette même capacité. La figure 13 C montre qu'en présence de chloramphénicol ces cellules précarencées en phosphore fabriquent des particules 30 S et 50 S résistantes à l'action in vivo de DNP tout comme en synthétisaient les bactéries de la souche PA1 ou ML 308. Dans nos conditions expérimentales, 25 % des produits acido-insolubles à froid marqués par le ^{32}P sont détruits par le DNP. Ce niveau de dégradation est atteint 45 minutes après l'addition de cet agent dans le milieu de culture.

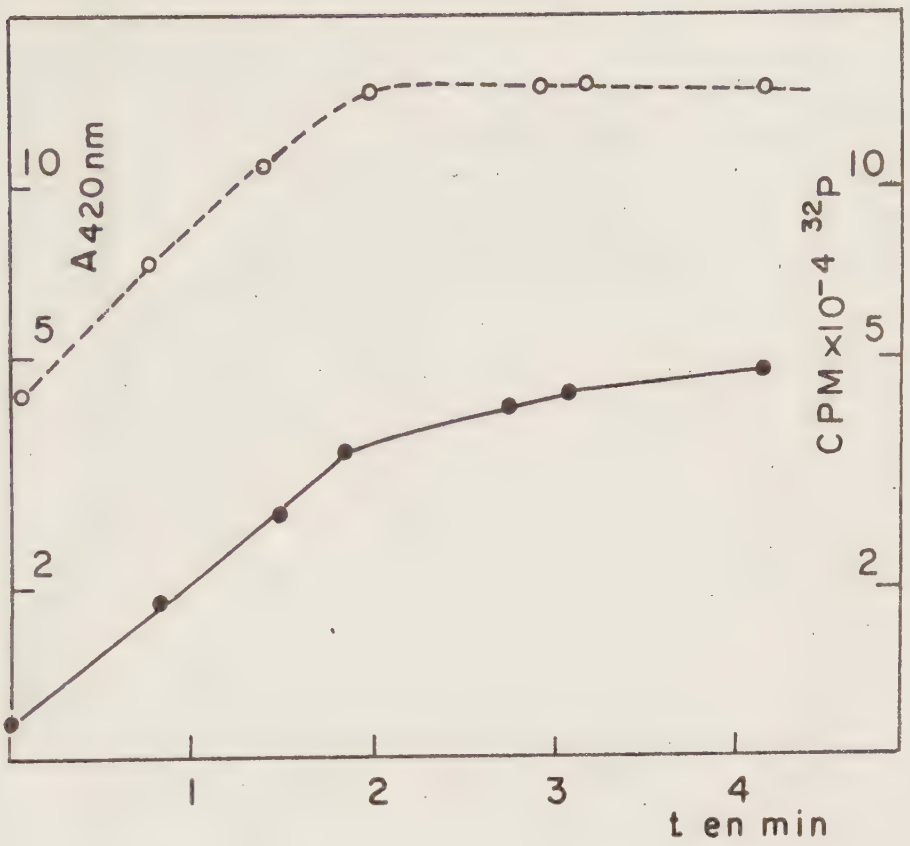


Figure 11 : CROISSANCE ET INCORPORATION DE ^{32}P PAR LA SOUCHE EA_2 CULTIVEE SUR MILIEU 68

Les cellules de la souche d'Escherichia Coli K 12 EA_2 (Met^-, $Biotine^-$, $Rel\ A^-$) isolée par le Dr. Brenner, sont cultivées à 30° C sur du milieu 68 contenant 0,4 % de glucose, 10 mM de L-méthionine et 1 mg/l de biotine en présence de ^{32}P - PO_4HNa_2. La densité optique de la culture est mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jean et Constant. La cinétique d'incorporation du ^{32}P dans les produits acido-insolubles à 4° C a été déterminée en prélevant des aliquots de 0,2 ml de la culture qui sont précipités dans 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 5 % contenant 100 mg/l de PO_4KH_2. Les précipités ont été recueillis et lavés sur filtre millipore (pores de diamètre moyen égal à 0,45 µ) et leur radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à courant gazeux Tracerlab.

●—●—● Densité optique à 420 nm.

o---o---o Radioactivité acido-insoluble à 4° C.

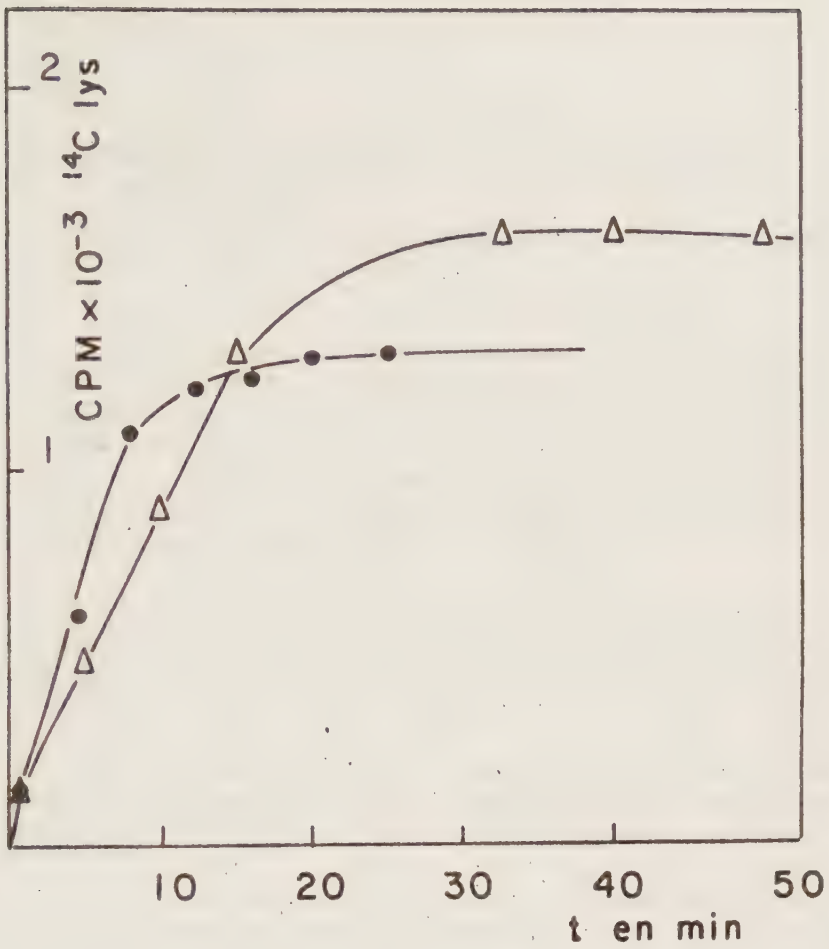


Figure 12 : CARENCE EN METHIONINE CHEZ DES CELLULES EA_2 TRAITEES PENDANT LA CROISSANCE EXPONENTIELLE ET AU COURS DE LA PRIVATION EN PHOSPHORE

Les bactéries récoltées en croissance exponentielle ont été recueillies sur membrane millipore et lavées deux fois avec du milieu 68 complémenté en glucose et biotine, mais ne contenant pas de méthionine. Les cellules ont été remises en suspension dans ce même milieu en présence de ^{14}C-Lysine.

Les cellules prélevées après 1 heure de carence en phosphore ont été filtrées et lavées deux fois avec du milieu 68 sans méthionine, ni phosphore, complémenté en glucose et biotine en présence de ^{14}C-Lysine (10µCi/mg/l).

Dans les deux cas, l'incorporation a été suivie en prélevant des aliquots de 0,1 ml qui ont été précipités dans du TCA 5 % contenant 50 mg/l de ^{12}C-lysine, puis chauffés à 90° C pendant 20 minutes. La mesure de la radioactivité a été effectuée dans les conditions identiques à celles décrites dans la figure 11.

●—●—● Incorporation dans les cellules prélevées au cours de la croissance exponentielle.

Δ—Δ—Δ Incorporation dans les cellules prélevées après 1 heure de carence en phosphore.

Figure 13 : FORMATION DE PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES PAR DES BACTERIES DE LA SOUCHE EA_2 EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE

Des bactéries en croissance exponentielle ont été récoltées et mises en suspension dans du milieu 68 sans méthionine selon la technique décrite dans la figure 12. Après 15 minutes d'incubation dans le milieu sans méthionine, on a ajouté le $^{32}P - PO_4HNa_2$ (15 mCi/litre). Un traitement par le 2-4 dinitrophénol (DNP) 5 mM a lieu 15 minutes plus tard et après 90 minutes d'incubation, les cellules sont récoltées. Leur extrait a été formé et analysé selon les méthodes décrites à la figure 7, le résultat de leur analyse est présenté dans la figure 13A.

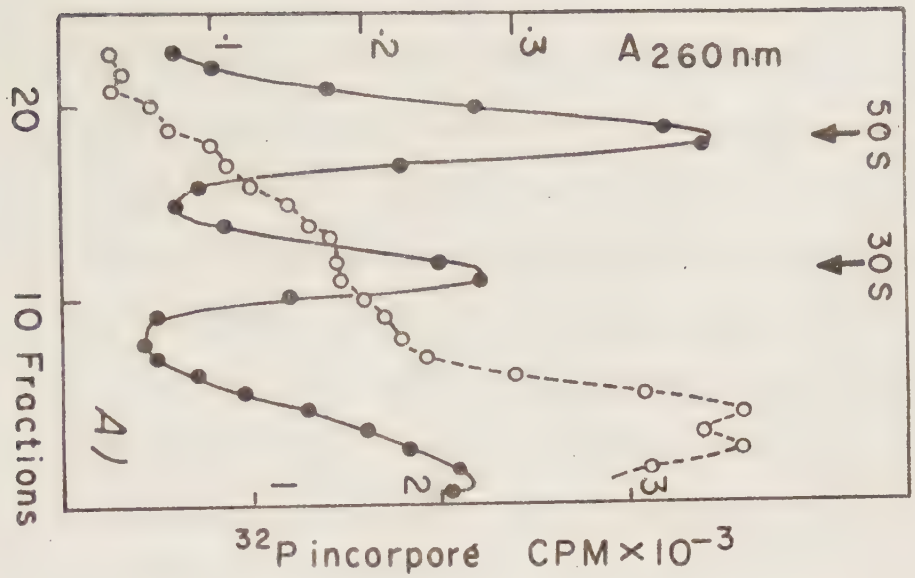
La figure 13B montre des extraits de bactéries marquées au $^{32}P - PO_4HNa_2$ après une heure de privation en phosphore et au cours d'une carence en méthionine provoquée par l'élimination de l'acide aminé du milieu de culture, dès les 30 minutes qui ont précédé l'addition du marqueur.

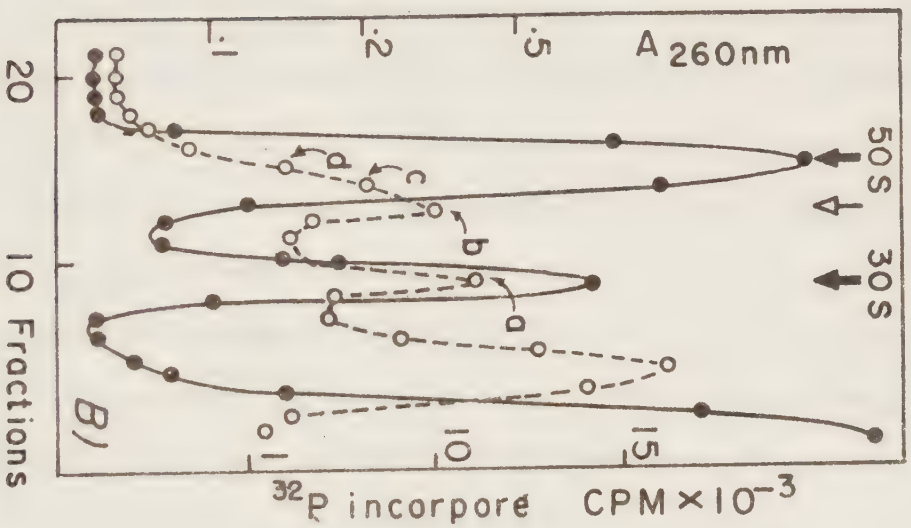
La figure 13C décrit l'analyse de l'extrait des cellules carencées une heure en phosphore, puis traitées par le chloramphénicol (100 µg/ml) et marquées au $^{32}P - PO_4HNa_2$ deux minutes après l'addition de l'antibiotique.

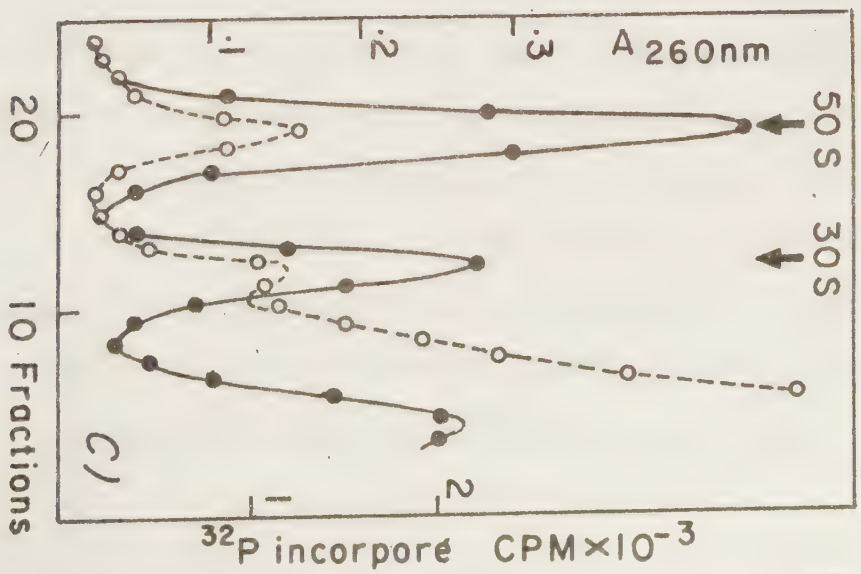
Dans les deux cultures dont les analyses sont présentées figures B et C, les cellules ont été traitées par le DNP dans les mêmes conditions que celles décrites dans la figure A après 15 minutes de marquage au $^{32}P - PO_4HNa_2$.

●———● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité TCA insoluble à froid.


A 260nm
50S
30S
20
10 Fractions
A)
1
2
3
^{32}P incorporé CPM×10^{-3}


A 260nm
50S
30S
20
10 Fractions
B)
a
b
c
d
^{32}P incorporé CPM×10^{-3}


A 260nm
50S
30S
20
10 Fractions
C)
1
2
^{32}P incorporé CPM×10^{-3}

Si cette capacité est mesurée en inhibant la traduction, non pas par addition de chloramphénicol, mais en privant les bactéries de méthionine, dans les mêmes conditions de carence en phosphore, les cellules accumulent alors des produits qui, en première analyse, ont des coefficients de sédimentation 30 S et 45 S (fig. 13B). Ces produits sont résistants à l'actior du DNP qui détruit, dès la première heure qui suit son addition dans ce milieu, 45 % des produits formés dans ces conditions de culture.

Alors que les particules accumulées par les bactéries traitées dans les mêmes conditions, mais carencées en arginine et non en méthionine (fig. 10B), présentaient après une seconde analyse sur gradient de saccharose des coefficients de sédimentation 30 S et 50 S (fig. 10D et 10C), les particules synthétisées par les bactéries privées de méthionine semblent très hétérogènes. Les fractions a, b, c, et d, isolées à partir du gradient présenté à la figure 13B, ont pour coefficient de sédimentation 28 S, 40 S, 44 S et 46 S, respectivement après avoir subi une seconde centrifugation (fig. 14). Ainsi on n'observe pas la formation de particules 50 S.

Si cet arrêt de la synthèse protéique se produit sur des cellules en croissance exponentielle, il se produit une accumulation très faible de particules de coefficient de sédimentation supérieur à 25 S et résistantes à l'action du DNP (fig. 13A). Dans ces conditions de marquage au ^{32}P - PO_4 HNa_2, le DNP dégrade près de 40 % de produits acido-insolubles radioactifs 60 minutes après son addition dans le milieu de culture. Il semble donc que l'absence de méthionine bloque le processus d'assemblage des sous-unités du ribosome même si des protéines

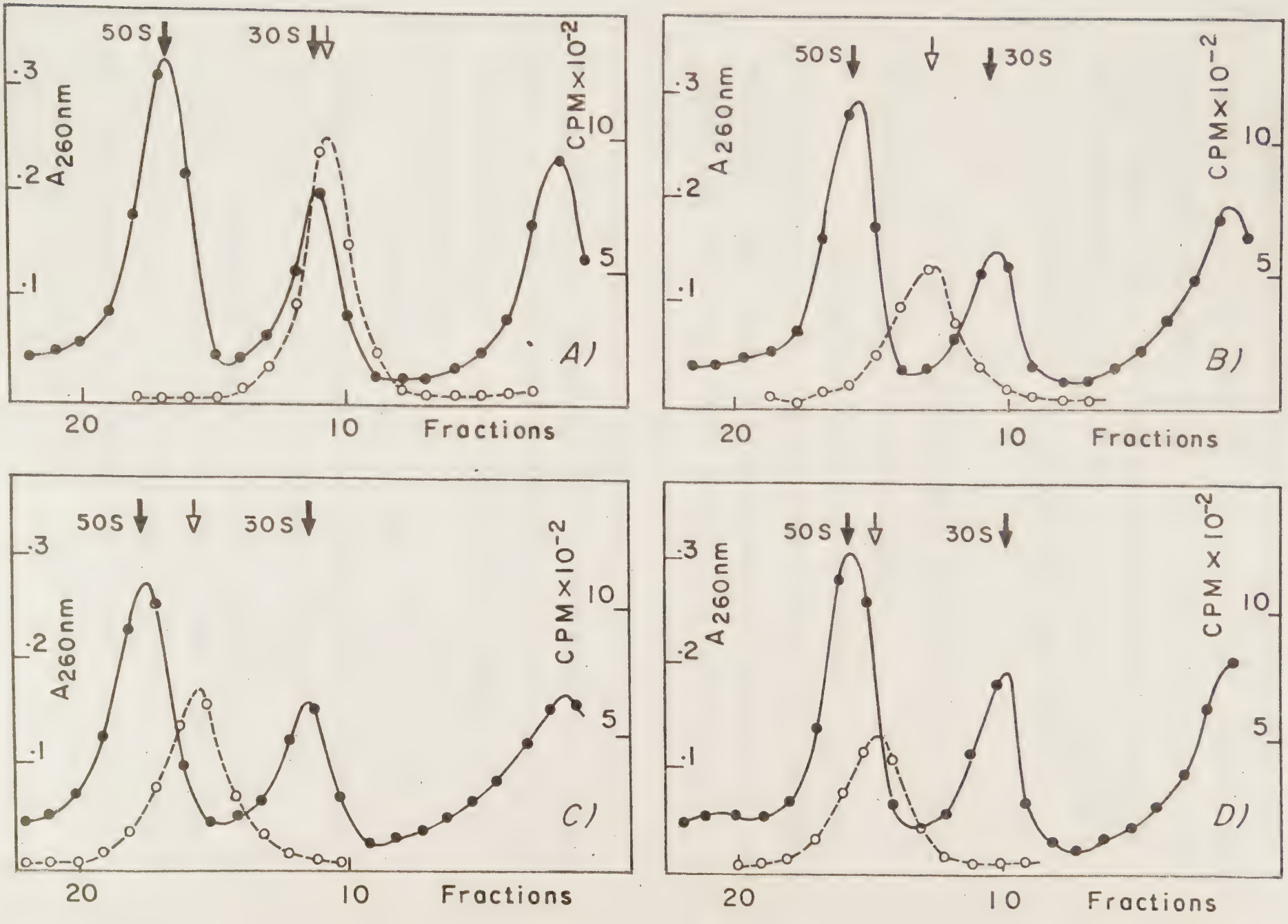
Figure 14 : HETEROGENEITE DES PARTICULES SYNTHETISEES PAR LES BACTERIES DE LA SOUCHE EA_2 CARENCEES EN METHIONINE AU COURS DE LA RESTAURATION EN PHOSPHORE

Les fractions a, b, c et d, de l'extrait analysé sur le gradient présenté dans la figure 13B ont été isolées et dialysées trois heures en présence d'un extrait de cellules EA_2 non marquées et récoltées pendant la phase exponentielle de leur croissance. La dialyse a été réalisée à 4° C contre le tampon Tris HCl 5.10^{-3}M pH 7.4 $MgCl_2$ 10^{-4}M.

Ces fractions ainsi traitées ont été centrifugées à nouveau sur gradient de saccharose. Les figures A, B, C et D correspondent respectivement à l'analyse des fractions a, b, c et d, de la figure 13B.

●———● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité ^{32}P acido-insoluble à froid.


50S
30S
A260nm
CPM×10⁻²
Fractions
A)
B)
C)
D)

ribosomiques libres sont présentes en quantité suffisante dans la cellule. L'hétérogénéité des particules fournies, de coefficient de sédimentation compris entre 40 S et 45 S, pourrait indiquer que la méthylation est nécessaire à une étape de l'assemblage de la sous-unité 50 S à laquelle participent de nombreuses macromolécules de manière coopérative.

b) Transformation in vivo des particules 40 S - 45 S après restauration de la méthionine.

L'étude du devenir des particules 40 S - 45 S accumulées au cours des modifications métaboliques que nous venons de décrire, nous a amené à rechercher les conditions qui nous permettraient de rendre cette évolution dépendante de la seule addition de la méthionine sans que de nouvelles synthèses de RNA ne se produisent. Nous avons choisi comme inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D. La préférence de l'utilisation de l'actinomycine D à celle du DNP est due au fait que celui-ci pourrait inhiber les réactions ATP dépendantes de méthylations des RNA.

Le passage de l'actinomycine D au travers de la membrane cellulaire nécessite une perméabilisation préalable des cellules, obtenue par un traitement à l'EDTA (93).

Nous avons adopté la technique décrite par Leive (93) à nos conditions de culture (fig. 15) et avons vérifié que si l'EDTA était requis pour perméabiliser les cellules il n'avait pas, par lui-même, dans les conditions où nous l'utilisions, d'effet sur la synthèse des RNA . L'actinomycine D inhibe

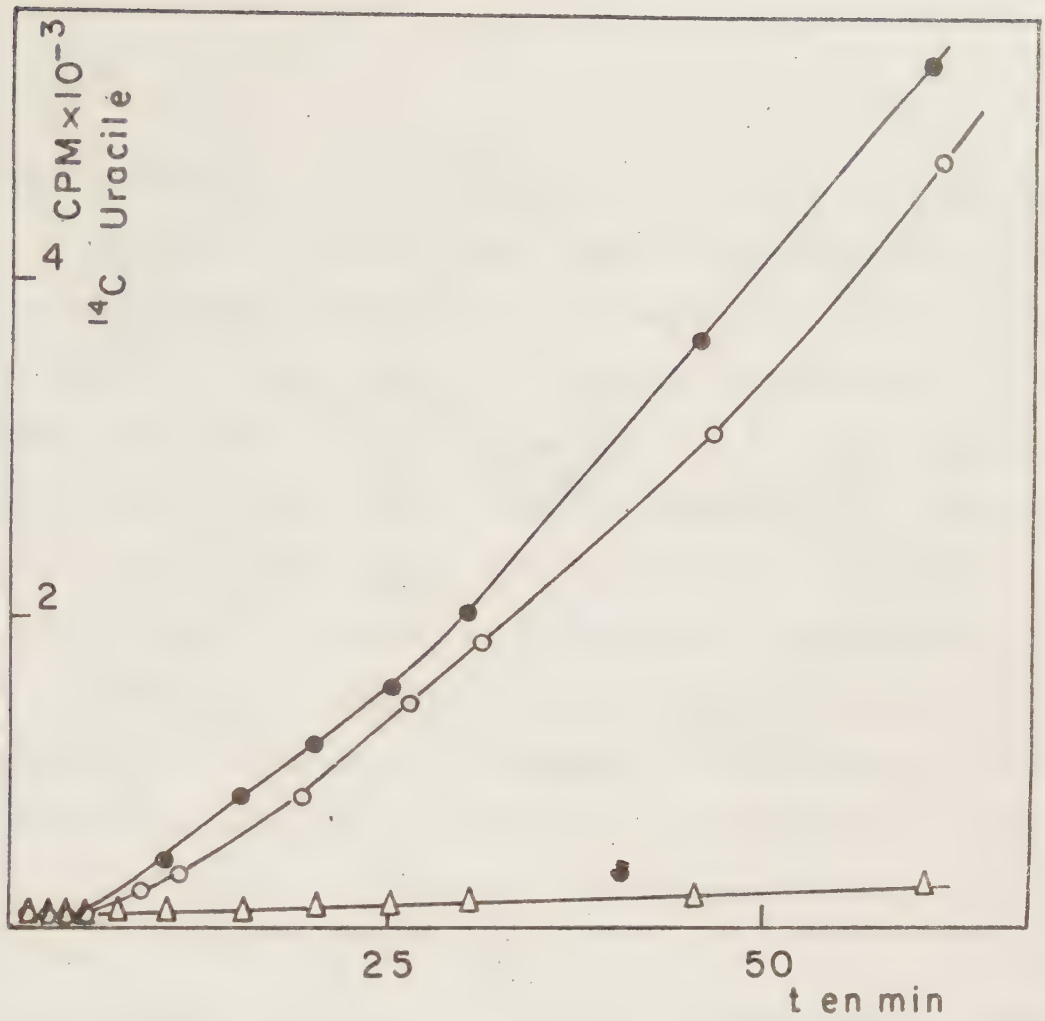


Figure 15 : ACTION DE L'ACTINOMYCINE D SUR LA SYNTHESE DES RNA DE LA SOUCHE EA_2 AU COURS DE LA RESTAURATION EN PHOSPHORE ET METHIONINE

Les cellules sont carencées 30 minutes en phosphore, puis 30 minutes en méthionine et phosphore. Après une heure de carence, le phosphore est rajouté à une concentration finale de 0.5 mM en présence de ^{12}C Uracile (10 mg/litre).

Après 15 minutes d'incubation pendant laquelle la carence en méthionine est maintenue, le milieu de culture est éliminé par filtration sur membrane millipore (diamètre 0.45 µ) et les cellules sont remises en suspension dans du tampon Tris HCl 0.12 M pH 8.0 (10^9 cellules/ml de tampon). Cette suspension est divisée en trois fractions (1,2,3). La fraction 3 est traitée par l'EDTA 0.2 mM pendant 4 minutes. Les fractions 1 et 2 reçoivent un volume d'eau équivalent à celui de la solution concentrée d'EDTA. Les trois fractions sont complémentées par 9 volumes de milieu 68 préincubé à 30° C ce qui permet, notamment, d'arrêter l'action de l'EDTA présent dans la fraction 3. On ajoute immédiatement au milieu de culture, le ^{14}C Uracile (0.8 mg/5 mCi/l) et la L-méthionine 1 mM. Les fractions 2 et 3 reçoivent l'actinomycine D (10 µg/ml).

L'incorporation du ^{14}C Uracile dans les RNA est déterminée par la mesure de la radioactivité TCA insoluble à froid des aliquots de 0.2 ml des cultures prélevés à des temps différents.

●——● contrôle

O——O + actinomycine D

cette synthèse pour des durées de traitement à l'EDTA de 2 ou 4 minutes, conditions dans lesquelles nous avons réalisé nos expériences. L'effet de l'actinomycine D sur la synthèse protéique est plus tardif. En absence de méthionine, une synthèse résiduelle ne représente que 30 % de celle observée après addition de l'acide aminé en présence de l'inhibiteur de la transcription (fig. 16). Ce mécanisme de traduction, qui fonctionne à nouveau en présence de l'actinomycine D et de la méthionine s'arrête 15 minutes après addition de l'antibiotique. Ce temps est nécessaire à la dégradation des RNA messagers transcrits au cours de la restauration en phosphore qui a précédé l'addition de l'actinomycine D (fig. 17). Cette dégradation des RNA instables est indépendante de la présence ou de l'absence de la méthionine. L'ensemble de ces informations nous a permis de définir les conditions dans lesquelles nous pouvions étudier la transformation des particules 40 S et 45 S sous l'influence du niveau de méthionine intracellulaire.

L'addition de la méthionine à des cellules traitées par l'actinomycine D, dans ces conditions, provoque la disparition des particules ribonucléoprotéiques 28 S et 40S-45 S préformées en absence de synthèse protéique au cours d'une restauration en phosphore. On observe, en effet, la seule présence de particules ayant le coefficient de sédimentation 30 S et 50 S des sous-unités ribosomiques (fig. 18B).

Au cours d'un même traitement par l'actinomycine D, mais en absence de méthionine, les particules 28 S et 40S-45 S préformées ne sont pas modifiées au regard de leurs propriétés de sédimentation en gradient de saccharose (fig. 18A). L'actinomycine D n'induit pas la dégradation <u>in vivo</u> de ces particules.

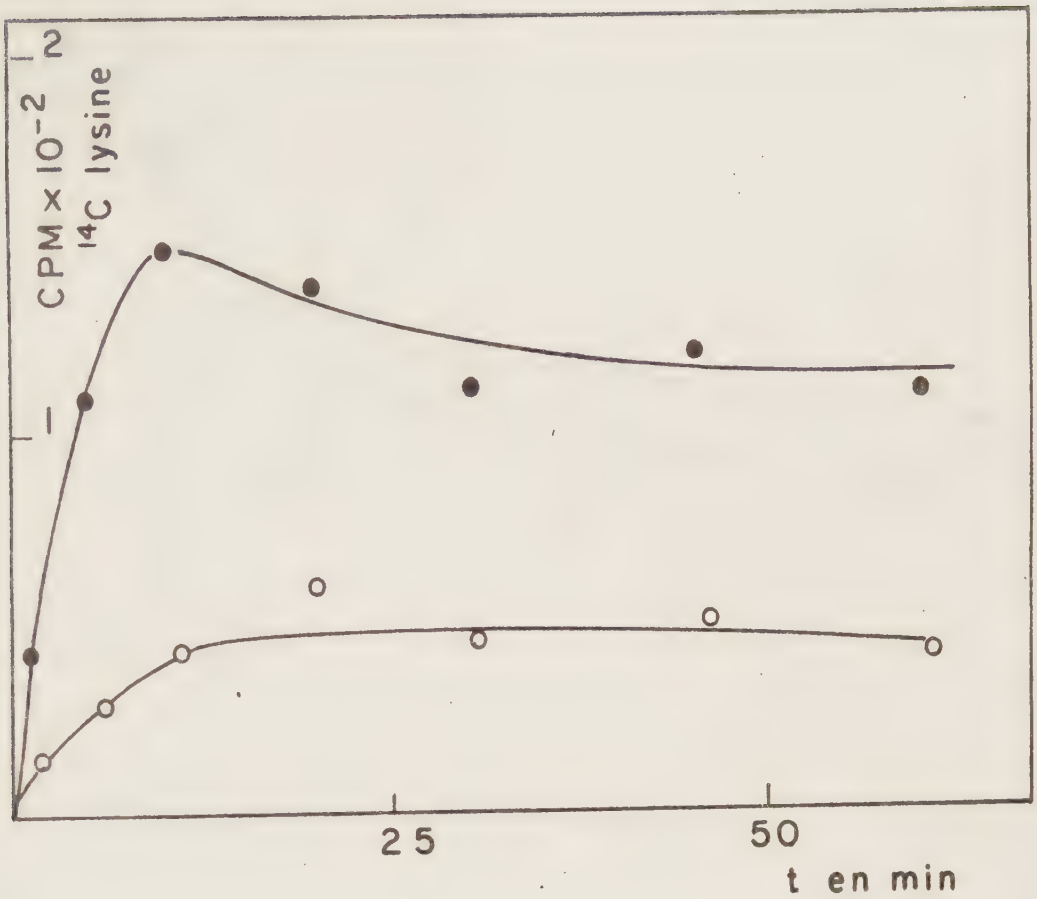


Figure 16 : INFLUENCE DE L'ACTINOMYCINE D SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE AU COURS DE LA RESTAURATION EN PHOSPHORE DE LA SOUCHE EA_2

Des bactéries de la souche EA_2 ont été carencées en phosphore et en méthionine, puis restaurées en phosphore avant addition de l'EDTA et de l'actinomycine D dans les conditions décrites figure 15.

Au moment de l'addition de l'actinomycine D, on ajoute aux cultures de la ^{14}C lysine (0.4 mCi/l, 2 mg/l de culture). Ce traitement par l'antibiotique est effectué en présence ou en absence de la méthionine (1 mM).

L'incorporation de ^{14}C lysine dans les protéines est déterminée en mesurant la radioactivité TCA insoluble à chaud des fractions de 0.2 ml de la culture.

●——● + méthionine

o——o - méthionine.

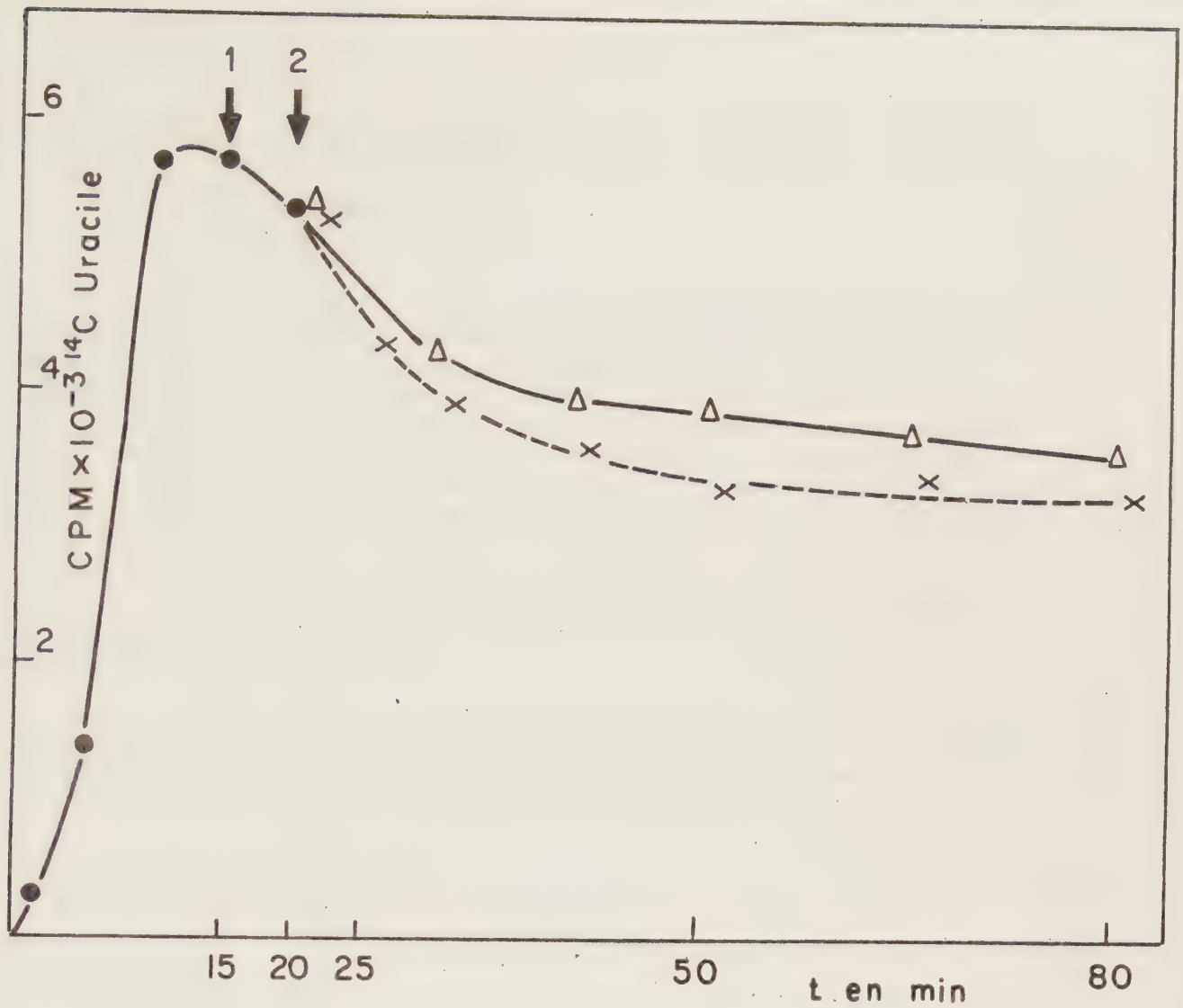


Figure 17 : ACTION DE L'ACTINOMYCINE D SUR LES RNA PREFORMES AU COURS DE LA RESTAURATION EN PHOSPHORE

A une culture de la souche EA_2 carencée 30 minutes en phosphore, puis 30 minutes en phosphore et méthionine, on ajoute 0.5 mM de phosphore (KH_2PO_4) et de ^{14}C Uracile (5 mCi/l, 3,4 mg/l). Après 15 minutes d'incubation en présence du marqueur, le milieu de culture est éliminé par filtration sur millipore (diamètre 0.45 µ). Les cellules sont resuspendues dans le tampon Tris HCl, 0.12 M, pH 8.0 et traitées par l'EDTA selon les conditions décrites dans la figure 16. La suspension cellulaire diluée dans le milieu 68 est séparée en deux fractions A et B recevant chacune de l'actinomycine D (10 µg/ml) et du ^{12}C Uracile (10 mg/l). La fraction A est complémentée par de la méthionine (1 mM) alors que la fraction B est maintenue en carence en l'acide aminé.

L'incorporation de l'Uracile dans les RNA est suivie par prélèvements de 0.2 ml des cultures précipités dans le TCA 5 % à froid. La radioactivité des précipités est mesurée. Le point 1 indique le moment d'addition de l'EDTA, le point 2 celui de l'actinomycine D et du ^{12}C Uracile.

Δ——Δ——Δ fraction A : actinomycine D + méthionine

Figure 18 : INFLUENCE DE LA METHIONINE SUR LA FORMATION DE PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES

A une culture carencée 30 min. en phosphore, puis 30 min. en phosphore et en méthionine, on ajoute du phosphate (KH_2PO_4 0.5 mM) et du ^{32}P sous forme d'acide phosphorique (3 mCi/100ml de culture). Après 15 min. de restauration en phosphore en présence du marqueur, les cellules sont traitées par l'EDTA et l'actinomycine D dans les conditions décrites figure 17. 30 secondes après l'addition de l'antibiotique, la culture est fractionnée en deux lots A et B, le premier n'est pas complémenté, on ajoute dans le second de la L-méthionine (1 mM). Après 20 min. d'incubation des deux cultures, les cellules sont récoltées.

Les extraits cellulaires sont formés, puis analysés au gradient de saccharose dans un tampon contenant $MgCl_2$ 10^{-4}M, selon les techniques décrites figure 13.

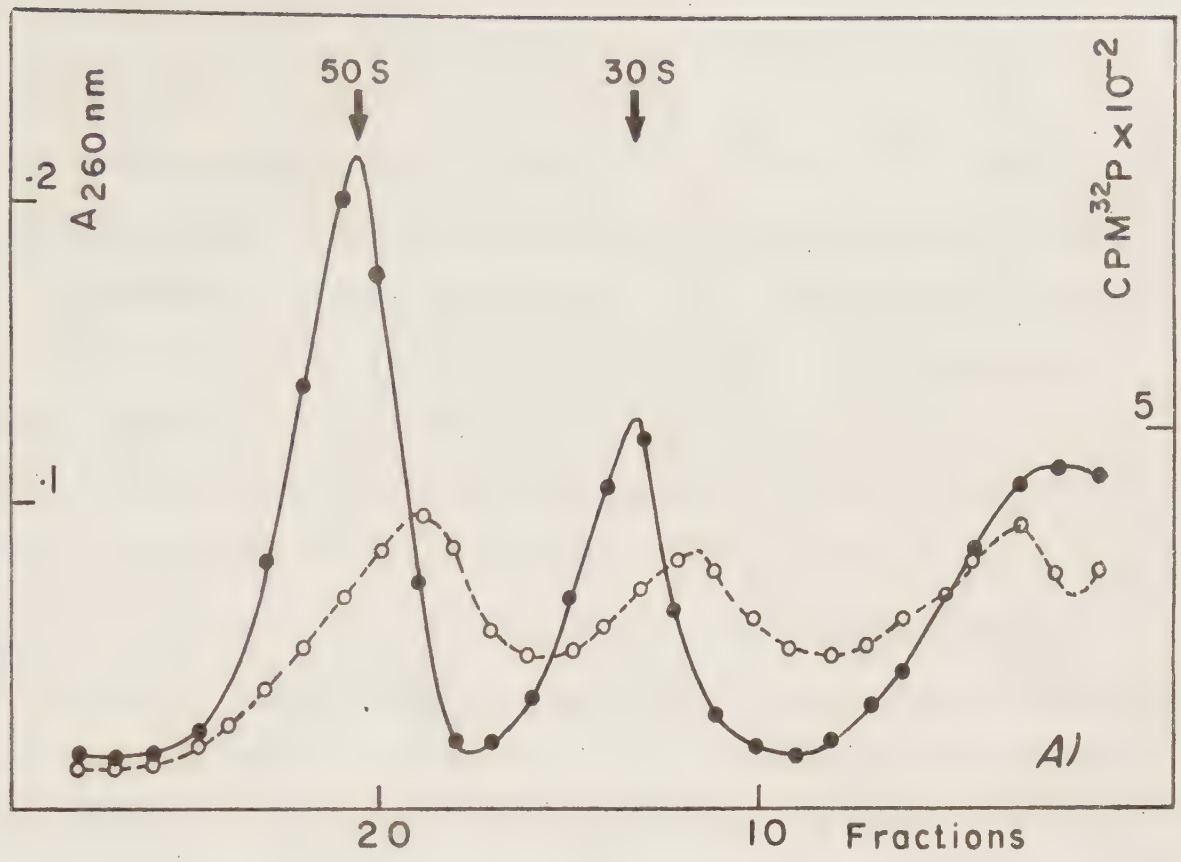
Tout au cours de l'incubation en présence du marqueur ^{32}P, on a suivi l'incorporation de celui-ci dans les produits TCA insolubles à froid afin de contrôler l'action de l'actinomycine D. Les résultats obtenus sont identiques à ceux présentés dans la figure 22.

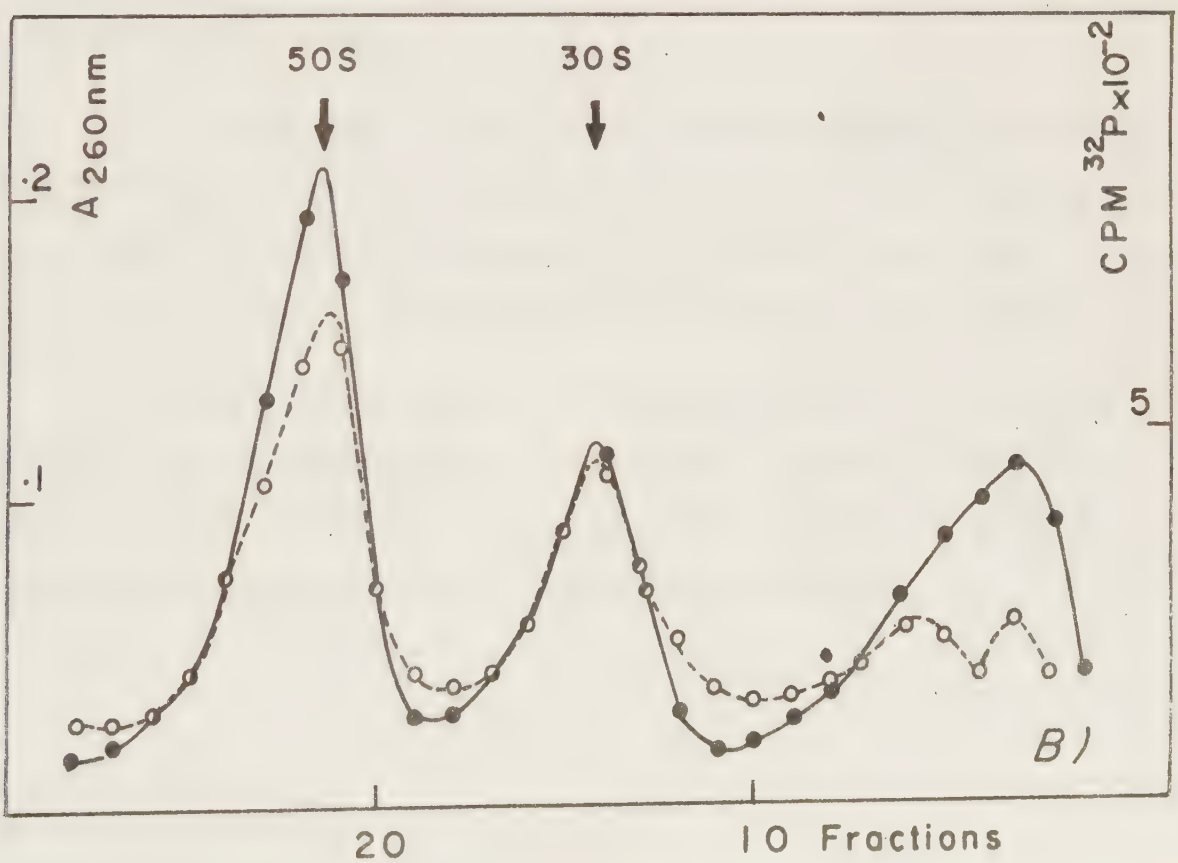
A) Extraits de cellules incubées en présence de l'actinomycine D sans addition de méthionine;

B) Extraits de cellules incubées en présence de l'actinomycine D + méthionine.

●——● Densité optique mesurée à 260 nm

X——X radioactivité ^{32}P, TCA insoluble à 4° C.


50S
30S
A260nm
·2
·1
CPM 32P x 10-2
5
A)
20
10
Fractions


50S
30S
A260nm
·2
·1
CPM 32P x10-2
5
B)
20
10 Fractions

Le ^{14}C Uracile traceur, utilisé au cours de ces expériences, permet de suivre l'évolution de ces particules ribonucléoprotéiques au niveau de leur RNA. On a vérifié que dans nos conditions expérimentales l'actinomycine D inhibe totalement la transcription (fig. 15). Il faut donc admettre que l'addition de la méthionine entraîne la transformation des produits 28 S et 40S-45 S en particules 30 S - 50 S. Ceci semble être vérifié par l'estimation quantitatives de ces différents éléments reportés dans le tableau IV.

Cette transformation méthionine dépendante des particules ribonucléoprotéiques peut résulter, soit de l'addition de protéines formées au cours de la synthèse résiduelle stimulée par l'addition de l'acide aminé limitant (fig. 16), soit d'une modification des RNA soit de l'action conjuguée des deux phénomènes.

Nous avons vu que toutes les protéines nécessaires à la formation des particules de coefficient de sédimentation 30 S et 50 S étaient présentes dans les cellules comme l'indiquent nos expériences réalisées en présence de chloramphénicol.

Il semble donc que l'étape limitante se situe au niveau des processus de transformation des RNA , ce qui a motivé notre étude sur les propriétés des RNA inclus dans ces différentes particules ribonucléoprotéiques.

TABLEAU IV

EFFETS DE LA METHIONINE SUR LES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES RESISTANTES A L'ACTION DE L'ACTINOMYCINE

	Coefficient de sédimentation	Radioactivité des particules (CPM)	Radioactivité spécifique
- Méthionine	28 S	1851	5450 $^{CPM}/_{I.A260}$ 30 S
	40-45 S	2484	3910 $^{CPM}/_{I.A260}$ 50 S
+ Méthionine	30 S	1746	5420 $^{CPM}/_{I.A260}$ 30 S
	50 S	2369	3860 $^{CPM}/_{I.A260}$ 50 S

L'estimation quantitative de la radioactivité spécifique des particules ribonucléoprotéiques et des ribosomes a été effectuée à partir des résultats présentés dans la figure 18.

III - MODIFICATIONS IN VIVO DES RNA RIBOSOMIQUES AU COURS DU PROCESSUS D'ASSEMBLAGE DES RIBOSOMES REALISE EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE

Nous avons rappelé dans l'introduction à ce premier chapitre que les RNA ribosomiques subissaient un ensemble de modifications post-transcriptionnelles avant d'être intégrés dans une sous-unité ribosomique biologiquement active.

Le fait que les formes précurseurs de RNA ribosomique sont accumulées au cours d'un arrêt de la synthèse protéique provoquée par addition de chloramphénicol (29,100) de puromycine (29,32), ou par une carence en un acide aminé essentiel d'une souche Rel A^- (36,37,101), laisse penser qu'une synthèse protéique active est nécessaire à la maturation de ces RNA. En fait, il est extrêmement difficile, compte tenu du pool très faible de protéines ribosomiques libres dans une cellule en croissance exponentielle, d'affirmer quels sont les éléments limitants de cette maturation. Est-ce que ce sont les enzymes responsables des modifications post-transcriptionnelles qui seraient soumises à un renouvellement rapide, ou bien est-ce que l'action de ces enzymes nécessite que les RNA soient inclus dans des particules ribonucléoprotéiques dont la formation serait limitée par la quantité de protéines ribosomiques libres disponibles ?

Notre système qui permet en absence de synthèse protéique active une augmentation du pool de ces protéines libres et les rend disponibles pour des RNA préformés, permet d'étudier ce problème.

Nous nous sommes intéressés à deux phénomènes du mécanisme postranscriptionnel : la perte d'oligonucléotides du RNA 5 S et du RNA 16 S et la méthylation du RNA 16 S.

On sait l'importance de la méthylation des RNA ribosomiques macromoléculaires dans l'activité biologique des sous-unités. La sensibilité ou la résistance de la sous-unité 50 S de Staphylococcus aureus à l'érythromycine (94) comme celles de la sous-unité 30 S d'Escherichia coli vis-à-vis de la kasugamycine (95), est en relation avec le degré de méthylation de leur RNA macromoléculaire. De plus, la colicine E3 qui induit la coupure d'une séquence de 50 nucléotides située à l'extrêmité 3'OH du RNA 16 S (96,97), inhibe toute synthèse protéique. Or, cette coupure qui n'entraîne pas in vivo de modifications quant à la composition protéique des sous-unités 30 S affectées (98) détache de celles-ci un fragment du RNA 16 S particulièrement riche en groupements méthyles (99).

La transformation de particules ribonucléoprotéiques incomplètes en sous unités 30 S et 50 S dépendante de l'addition de méthionine, nous permet de préciser l'influence de la méthylation sur le processus de biogénèse du ribosome.

1 - IDENTIFICATION DU RNA 5 S DANS LES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES FORMEES EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE

Dès 1965, Roland Rosset et Roger Monier avaient observé l'accumulation chez des bactéries traitées par le chloramphénicol d'un RNA soluble de faible poids moléculaire retenu plus fortement que le RNA 5 S sur une colonne de Kieselguhr imprégnée de sérum albumine méthylée. Dans ces mêmes conditions,

on n'observait pas la présence de RNA 5 S. Ce RNA particulier n'était pas associé aux particules 18 S et 25 S et avait une composition en nucléotides estimée selon la méthode d'Osawa et Coll. (102) proche de celle du RNA 5 S (103)(tableau V).

Des résultats analogues ont été publiés par d'autres laboratoires (104). Les travaux poursuivis par le groupe de Roger Monier ont permis de montrer que ce RNA se différenciait du RNA 5S normal par l'addition de 1, mais plus souvent de 2 ou 3 nucléotides à l'extrêmité 5'phosphate de la molécule (105).

De plus, en 1967, nous avions avec R. Alcantara, Gomes et R. Monier mis en évidence chez les cellules de la souche EA_2 d'Escherichia coli carencées en méthionine à partir d'une culture en phase exponentielle, l'accumulation d'un RNA aux propriétés chromatographiques analogues à celles du RNA de faible poids moléculaire synthétisé en présence de chloramphénicol. Jean Feunteun (72) a pu montrer que ce RNA était aussi un mélange de trois espèces moléculaires semblables à celles observées chez des bactéries traitées au chloramphénicol.

Les formes moléculaires ayant été décrites dans des cellules en croissance exponentielle (106), leur cinétique ayant permis de préciser la correspondance entre ces différentes formes moléculaires (72), il apparait que quel que soit le mode d'arrêt de la traduction, celui-ci bloque la maturation des RNA 5 S et favorise l'accumulation de ces précurseurs.

a) Présence du RNA 5 S dans les particules 50 S formées par des cellules traitées au chloramphénicol.

Afin d'isoler, en évitant les contaminations par des particules ribonucléoprotéiques incomplètes, les produits 50 S

TABLEAU V

COMPOSITION EN NUCLEOSIDE MONOPHOSPHATE DU RNA 5 S CHLORAMPHENICOL SOUMIS A L'HYDROLYSE ALCALINE

Nucléosides monophosphatés	RNA 5 S	RNA 5 S CAM	RNA 5S CAM/RNA 5 S
CMP	29.9	27.9	1.00 (1.00)[1]
AMP	18.5	22.0	1.23 (1.20)[2]
GMP	34.8	33.3	0.99 (1.00)[1]
UMP	16.6	16.4	1.04 (1.08)[1]

L'analyse des RNA a été effectuée à partir de RNA 5 S ou RNA 5 S chloramphénicol isolés après deux chromatographies successives sur colonne de MAK. Les produits ainsi purifiés ont été soumis à l'hydrolyse alcaline par traitement à 37° C pendant 18 heures en présence de KOH 0.3 N, puis analysés sur une colonne de résine Dowex selon la méthode décrite par Osawa et Coll. (102). Le rapport RNA 5 S CAM/RNA 5 S a été calculé d'après la séquence du RNA 5 S normal publiée par Brownlee et Coll. (362) et à partir de la détermination des fréquences des différentes formes précurseurs du RNA 5 S qui sont accumulées chez des cellules traitées par le chloramphénicol. Ces données ont été décrites par Forget et Jordan (124) et par Feunteun (72). La détermination de l'AMP tient compte de la proposition de Griffin et Baillie (363). Les valeurs sont indiquées entre parenthèses. Les estimations relatives à nos résultats ont été effectuées sur la base d'une quantité identique de CMP dans le RNA 5 S normal et ses formes précurseurs. En effet, aucun précurseur du RNA 5 S décrit jusqu'ici, ne présente un excès de CMP par rapport à la molécule mature.

1 - Valeur calculée selon les résultats de Forget et Jordan (124) et de Feunteun (72).

2 - Valeur calculée selon les résultats de Griffin et Baillie (363).

synthétisés en présence de chloramphénicol, nous avons fait un marquage avec du ^{14}C Uracile en carence de phosphore et en présence de l'antibiotique. Les RNA ont été analysés à partir de particules 50 S isolées sur gradient de saccharose. La figure 19 montre que les particules 50 S contiennent un RNA 5 S aux propriétés chromatographiques normales donc différentes de celles des précurseurs accumulés lors d'un traitement au chloramphénicol de bactéries en croissance exponentielle.

De plus, ce RNA est présent en quantité stoechiométrique avec le RNA 23 S.

Cette observation semble indiquer que la présence de protéines ribosomiques libres est suffisante à la maturation du RNA 5 S et que celle-ci peut avoir lieu même en absence de synthèse protéique active.

b) RNA de faible poids moléculaire présent dans les particules 40 S-45 S synthétisées en absence de méthionine par la souche EA_2 carencée en phosphore.

La figure 20 montre que les particules 40 S-45 S isolées sur gradient de saccharose contiennent du RNA 23 S et du RNA 5 S. Ce dernier a les propriétés chromatographiques caractéristiques du RNA 5 S normal. Seule une légère dissymétrie du pic de ce RNA est décelable. Les RNA sont présents en quantité stoechiométrique dans les particules ribonucléoprotéiques analysées. Il est important de noter que le RNA 5 S ne contient pas de bases méthylées. L'hétérogénéité des particules 40 S-45 S peut rendre compte de la légère dissymétrie du pic du RNA 5 S. Certaines particules ribonucléoprotéiques

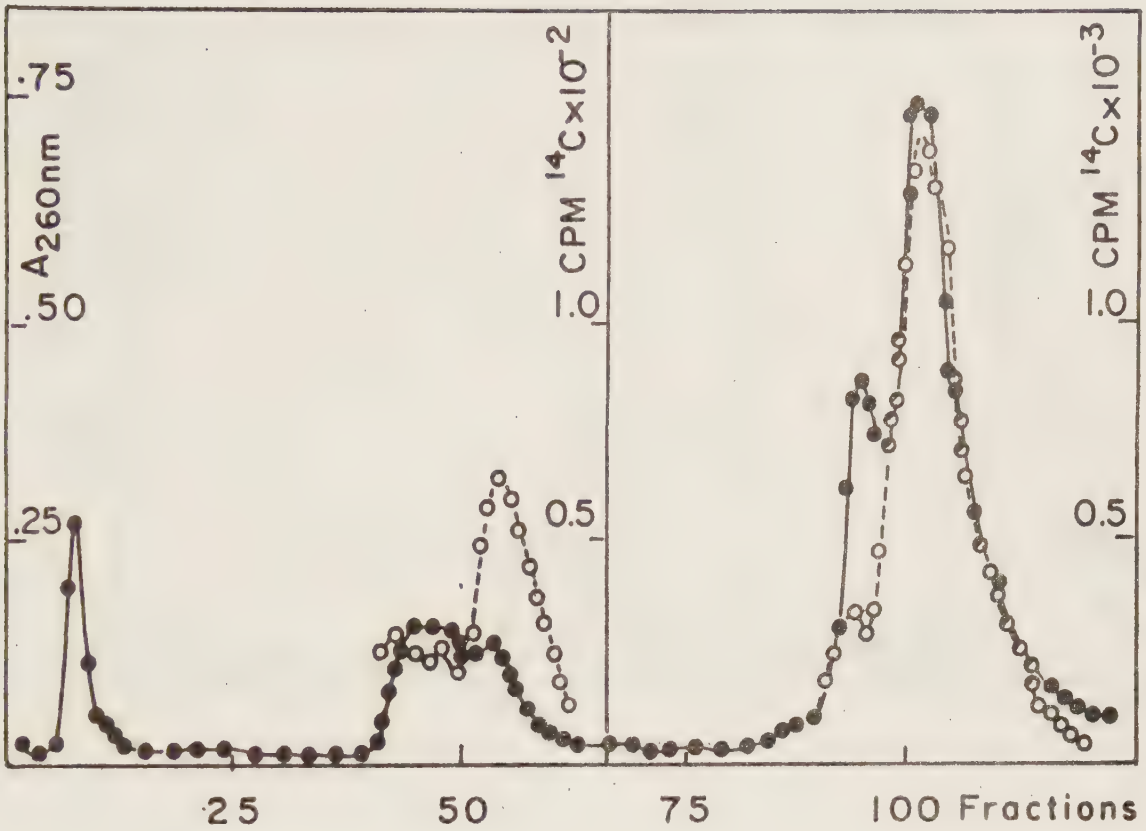


Figure 19 : ANALYSE DES RNA PRESENTS DANS LES PARTICULES CHLORAMPHENICOL 50 S FORMEES AU COURS DE LA CARENCE EN PHOSPHORE

A une culture d'Escherichia coli (souche ML 308) carencée pendant 210 minutes en phosphore, on ajoute du chloramphénicol (100 µg/ml), puis 2 minutes plus tard du ^{14}C Uracile (0.6 mCi/200 ml de culture, 25.8 mC/mmole). Après 45 min. d'incubation en présence du marqueur, les cellules sont récoltées et leurs extraits sont formés dans un tampon contenant Mg Cl_2 10^{-4}M. Ces extraits sont analysés sur gradient de saccharose 5-20 % et les fractions correspondant au pic des particules 50 S marquées au ^{14}C Uracile sont déprotéinisées en présence de RNA total entraîneur provenant de cellules ML 308 récoltées au cours de la croissance exponentielle. Les conditions de déprotéinisation et d'analyse sur colonne de sérum albumine méthylée sont décrites dans la figure 5.

●——● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité ^{14}C Uracile TCA insoluble à 4° C.

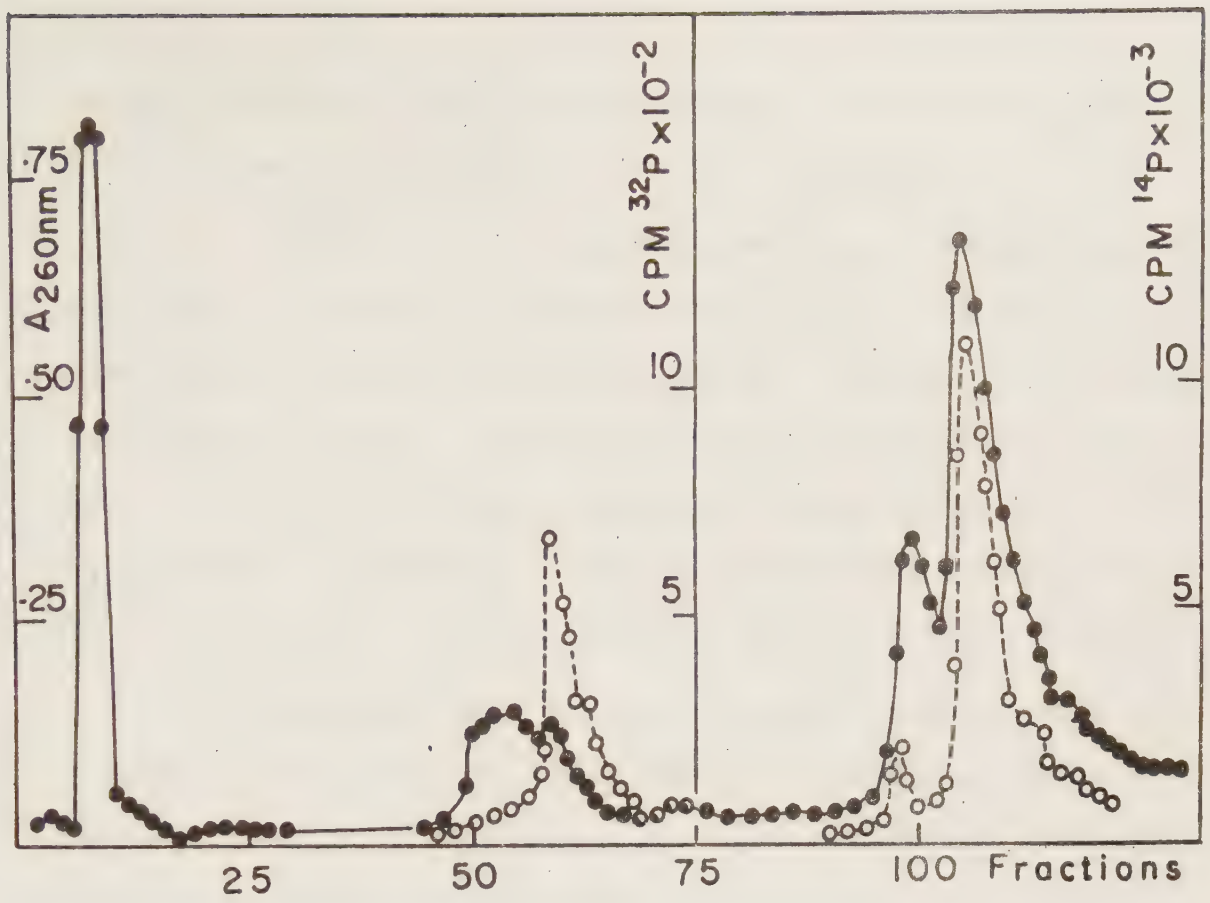


Figure 20 : PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES RNA PRESENTS DANS LES PARTICULES 43 S - 45 S ACCUMULEES PAR LES CELLULES DE LA SOUCHE EA_2 CARENCEES EN PHOSPHORE ET METHIONINE

Les particules 43 S - 45 S ont été isolées à partir de l'extrait analysé sur gradient de saccharose présenté dans la figure 13B. Les fractions correspondant au pic 43 S - 45 S, ainsi isolées, ont été déprotéinisées en présence de RNA total entraîneur obtenu à partir de cellules EA_2 récoltées au cours de la croissance exponentielle.

L'analyse chromatographique des RNA a été effectuée sur colonne de sérum albumine méthylée dans les conditions décrites figure 5. L'élution a été réalisée par un gradient de concentration de NaCl 0.2 M à 1.1 M dans un tampon Tris HCl, 50 mM, pH 6.7.

●——● Densité optique mesurée à 260 nm.

O-----O Radioactivité TCA insoluble à 4° C.

peuvent présenter une forme précurseur, cette étape serait décisive pour la maturation du RNA 5 S in vivo.

De l'ensemble de ces observations, on peut conclure que même en absence de synthèse protéique active, dans des conditions où la transcription des RNA stables est maintenue, la formation du RNA 5 S à partir de ses précurseurs contenant deux ou trois nucléotides supplémentaires est dépendante de la présence de protéines ribosomiques libres, susceptibles de participer à la formation de particules 40 S-45 S ou 50 S.

Nos méthodes d'analyse ne nous ont pas permis de déceler des différences entre les propriétés des RNA 23 S de la sous-unité 50 S normale et celles contenues dans les particules ribonucléoprotéiques 50 S de cellules traitées par le chloramphénicol ou 40 S-45 S de cellules EA_2 carencées en méthionine.

2 - PROPRIETES DES RNA MACROMOLECULAIRES PRESENTS DANS LES PARTICULES 30 S OU 28 S ACCUMULEES EN ABSENCE DE SYNTHESE PROTEIQUE

Le comportement sur colonne de MAK des RNA présents dans les particules 30 S accumulées en présence de chloramphénicol au cours d'une restauration au phosphore est semblable à celui des RNA inclus dans des sous-unités 30 S normales (fig. 21B). Ces RNA diffèrent des RNA accumulés dans le cytoplasme de cellules exponentielles traitées par le chloramphénicol (fig. 21A). Des protéines ribosomiques permettent donc la conversion de ce RNA précurseur du 16 S en RNA 16 S. Ceci semblerait justifier l'hypothèse selon laquelle une synthèse protéique active n'est pas indispensable à cette conversion.

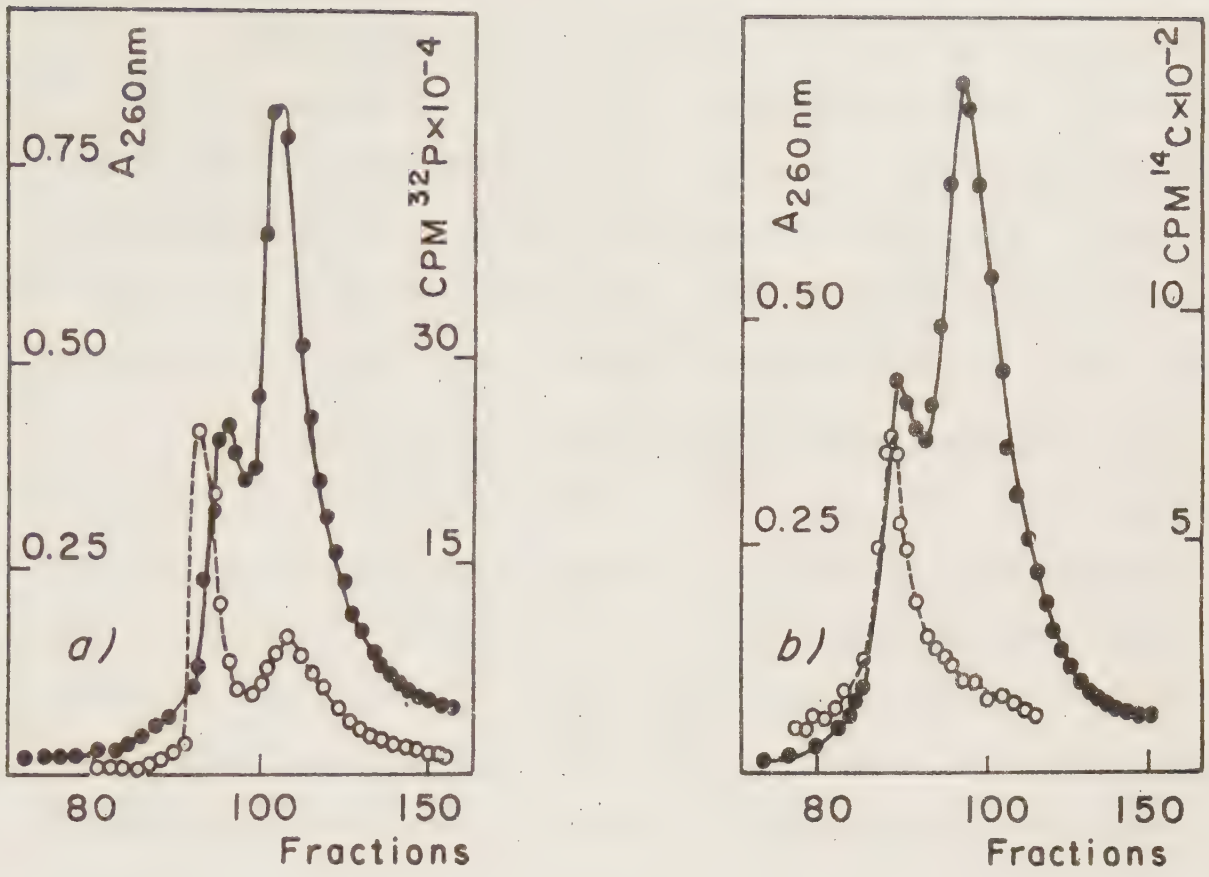


Figure 21 : ANALYSE DE RNA ACCUMULES PAR DES CELLULES TRAITEES AU CHLORAMPHENICOL AVANT ET APRES UNE CARENCE EN PHOSPHORE

A une culture d'Escherichia coli (souche ML 308) en croissance exponentielle, on ajoute du chloramphénicol (100 µg/ml) et 2 min. après du ^{32}P - PO_4HNa_2 (20 mCi/l). Après 30 min. d'incubation en présence de l'antibiotique, les cellules sont récoltées. Leur extrait est déprotéinisé, et l'analyse des RNA est effectuée sur colonne de sérum albumine méthylée selon la technique décrite à la figure 5. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la figure A).

Les particules 30 S chloramphénicol formées après une carence en phosphore et marquées au ^{14}C Uracile ont été isolées dans les conditions décrites à la figure 19. Elles ont été déprotéinisées en présence de RNA total entraîneur extrait de cellules en croissance exponentielle. Les RNA ont été analysés dans les conditions indiquées ci-dessus. Les résultats de cette analyse sont présentés sur le graphique B).

●——● Densité optique à 260 nm.

O-----O Radioactivité TCA insoluble à 4° C.

Mais une telle transformation de la forme précurseur à la forme normale du RNA 16 S n'est possible que si la méthylation est assurée. Dans les conditions où l'arrêt de la synthèse protéique résulte de la carence en méthionine, le RNA présent dans les particules 28 S a des propriétés chromatographiques analogues à celles du RNA précurseur du 16 S (fig.23A).

Au cours d'un traitement par l'actinomycine D qui inhibe toute synthèse nouvelle de RNA (fig. 22), les particules isolées de cellules traitées en présence de méthionine ont un RNA dont les propriétés chromatographiques sont analogues à celles du RNA 16 S (fig. 23C). Les particules isolées de cellules traitées dans les mêmes conditions, mais en absence de méthionine contiennent un RNA aux propriétés chromatiques semblables à celles des précurseurs de RNA 16 S (fig. 23B).

Par ailleurs, Jean Feunteun (72) a pu montrer que les particules 28 S présentaient <u>in vitro</u> une capacité acceptrice de groupements méthyl à partir de la S. adénosyl méthionine très supérieure à celle des sous-unités ribosomiques.

Le fait que les protéines ribosomiques nécessaires à la formation d'une particule 30 S soient présentes dans la cellule ne nous permet cependant pas d'affirmer que seule la méthylation soit nécessaire aux dernières étapes de l'assemblage des particules 30 S et 50 S à partir des particules 28 et 40 S-45 S respectivement. La méthylation peut être requise pour l'addition de protéines ribosomiques nécessaires à ces étapes finales comme elle pourrait l'être pour d'autres événements indispensables à la maturation des précurseurs du RNA 16 S (coupure de séquences nucléotidiques excédentaires au RNA 16 S normal, par exemple).

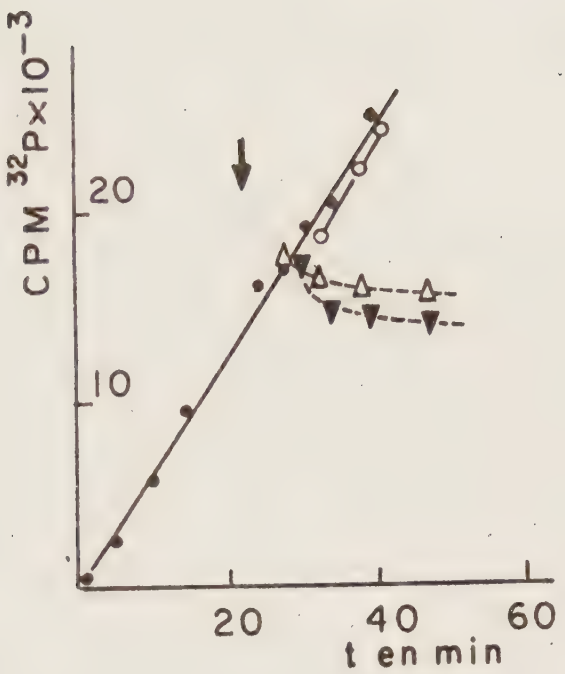


Figure 22 : EFFET DE L'ACTINOMYCINE D SUR L'INCORPORATION DU ^{32}P SANS LES RNA DES CELLULES EA_2 EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE METHIONINE

Une culture de bactéries de la souche EA_2 traitée dans les conditions décrites à la figure 18 (carence en phosphore, en phosphore et en méthionine, restauration en phosphore en présence de ^{32}P, incubation avec de l'EDTA) a été divisée en quatre lots de même volume. Le premier est incubé sans actinomycine D et en présence de méthionine (●——●), le second sans actinomycine D et en absence de méthionine (O——O), le troisième en présence d'actinomycine D et de méthionine (Δ-----Δ) et le quatrième en présence d'actinomycine D et en absence de méthionine (▼-----▼).

La radioactivité TCA insoluble à 4° C est déterminée sur des fractions aliquotes de 0.1 ml des différentes cultures. La flèche indique le moment d'addition de l'actinomycine D dans les lots 3 et 4. L'actinomycine D et la L-méthionine sont utilisées à des concentrations finales de 10 µg/ml et de 1 mM respectivement.

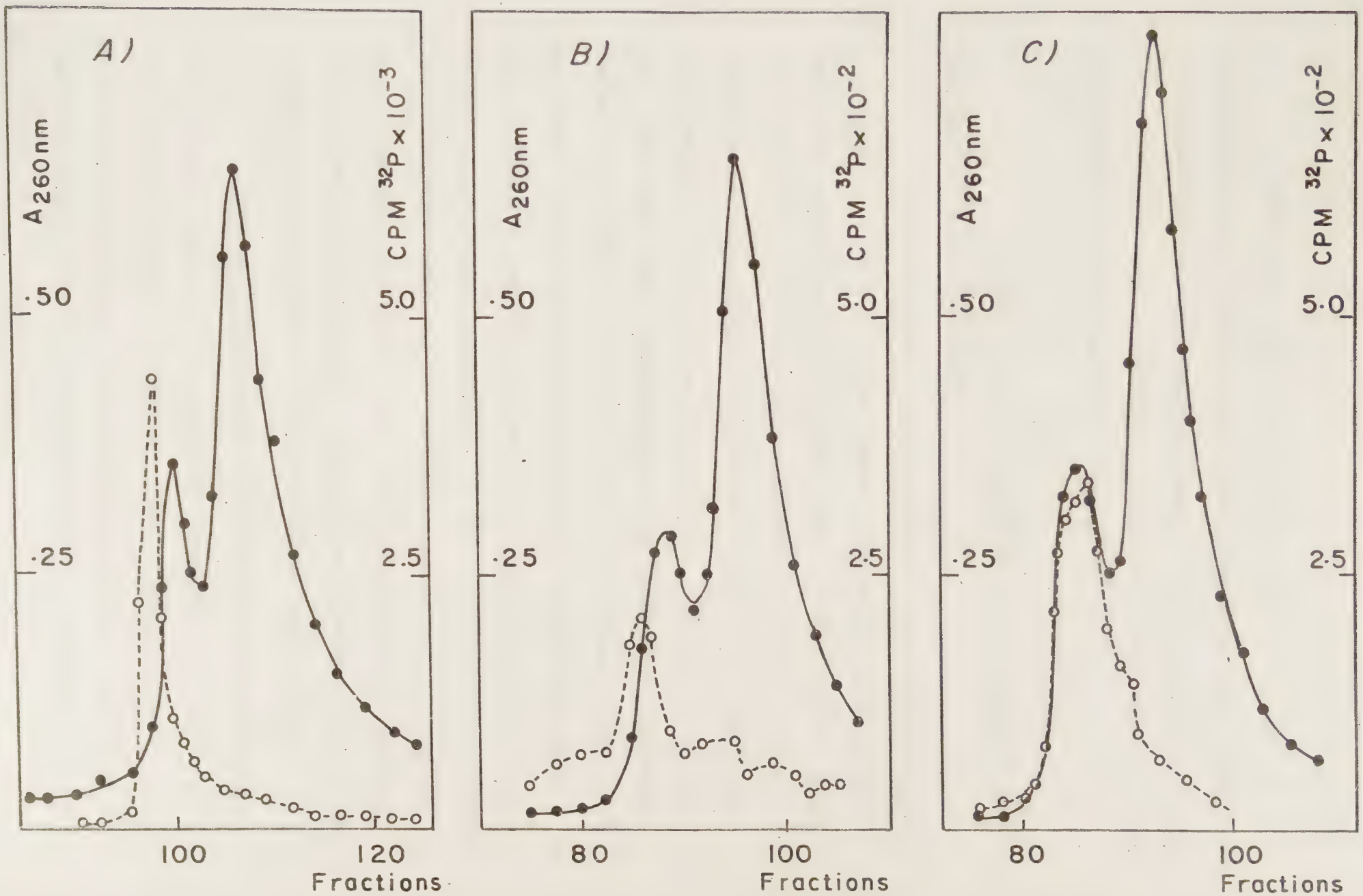
Figure 23 : EFFET DE L'ADDITION DE LA METHIONINE SUR LES RNA DES PARTICULES 28 S ACCUMULEES PAR LES CELLULES DE LA SOUCHE EA_2 AU COURS D'UNE CARENCE EN PHOSPHORE

Une culture d'Escherichia coli (souche EA_2) est carencée 30 min. en phosphore, puis 30 min. en phosphore et en méthionine. Du phosphate ($KH_2 PO_4$ 0.5 mM) et du ^{32}P-$PO_4 HNa_2$ (15 mCi/litre) sont alors ajoutés à la culture. Après 15 min. d'incubation en présence du marqueur radioactif, les cellules sont traitées par le DNP 5 mM (solution concentrée préparée dans le tampon Tris HCl, 0.1 M, pH 7.6) pendant 90 minutes, puis récoltées. L'extrait cellulaire est formé et analysé dans un tampon contenant $Mg Cl_2$ 10^{-4}M (selon des conditions décrites figure 13B). Les particules 28 S- 30 S isolées à partir de l'analyse sur gradient de saccharose sont déprotéinisées en présence de RNA total entraîneur provenant de cellules EA_2 récoltées au cours de la croissance exponentielle. L'analyse des RNA effectuée sur colonne de sérum albumine méthylée, selon les techniques décrites à la figure 5, est reportée sur le graphique A.

Par ailleurs, une culture de la souche EA_2, carencée comme précédemment en phosphore, en phosphore et méthionine, puis restaurée en phosphore (0.5 mM) en présence de ^{32}P acide phosphorique (30 mCi/l) pendant 15 minutes, a été traitée par l'EDTA et l'actinomycine D dans les conditions décrites à la figure 18. Après addition de l'antibiotique, la culture est séparée en deux fractions, l'une est maintenue en carence de méthionine, l'autre est complémentée en cet acide aminé. Les cellules des deux cultures sont récoltées après 20 min. de traitement par l'actinomycine D. Leurs extraits sont formés et analysés dans les conditions décrites à la figure 18. Les fractions correspondant aux particules 28 S de la figure 18A (Extrait de cellules traitées par l'actinomycine D sans méthionine) et aux particules 30 S de la figure 18B (Extrait de cellules traitées par l'actinomycine D et complémentées en L-méthionine) sont récoltées et déprotéinisées en présence de RNA total entraîneur obtenus à partir de cellules EA_2 récoltées en phase exponentielle de croissance. L'analyse des RNA est effectuée dans les conditions décrites ci-dessus. Les graphiques B et C indiquent le comportement chromatographique des RNA extraits des particules 28 S et 30 S respectivement.

●——● Densité optique à 260 nm

O------O Radioactivité TCA insoluble à 4° C.


A)
A260nm
.50
.25
CPM 32P x 10-3
5.0
2.5
100
120
Fractions
B)
A260nm
.50
.25
CPM 32P x 10-2
5.0
2.5
80
100
Fractions
C)
A260nm
.50
.25
CPM 32P x 10-2
5.0
2.5
80
100
Fractions

Néanmoins, les protéines ribosomiques jouent un rôle fondamental dans la maturation des RNA ribosomiques, donc dans leur aptitude à former des sous unités biologiquement actives, à la condition que le mécanisme postranscriptionnel comme celui de la méthylation puisse être assuré.

3 - EFFETS DE L'INCORPORATION DU 5 FLUOROURACILE SUR L'ASSEMBLAGE DES RIBOSOMES

L'addition de 5 fluorouracile à une culture d'Escherichia coli en cours de croissance exponentielle est suivie par l'incorporation de l'analogue dans les RNA (107). Dans ces conditions, la cellule est incapable de former des ribosomes, mais accumule des particules 28 S et 32 S (23) contenant des RNA assimilables aux RNA 16 S, 23 S et 5 S, mais dont les propriétés chromatographiques diffèrent des RNA normaux (85,108,109,110 et fig. 24). Cette observation n'est cependant pas suffisante pour justifier l'hypothèse selon laquelle seuls ces RNA stables sont responsables de la formation de particules anormales. Le fait que le 5 Fluorouracile soit incorporé dans les RNA messagers et augmente ainsi le taux d'erreurs de lecture (111,112) peut très bien conduire à la formation de protéines ribosomiques anormales qui soient incapables de participer à la synthèse de sous unités.

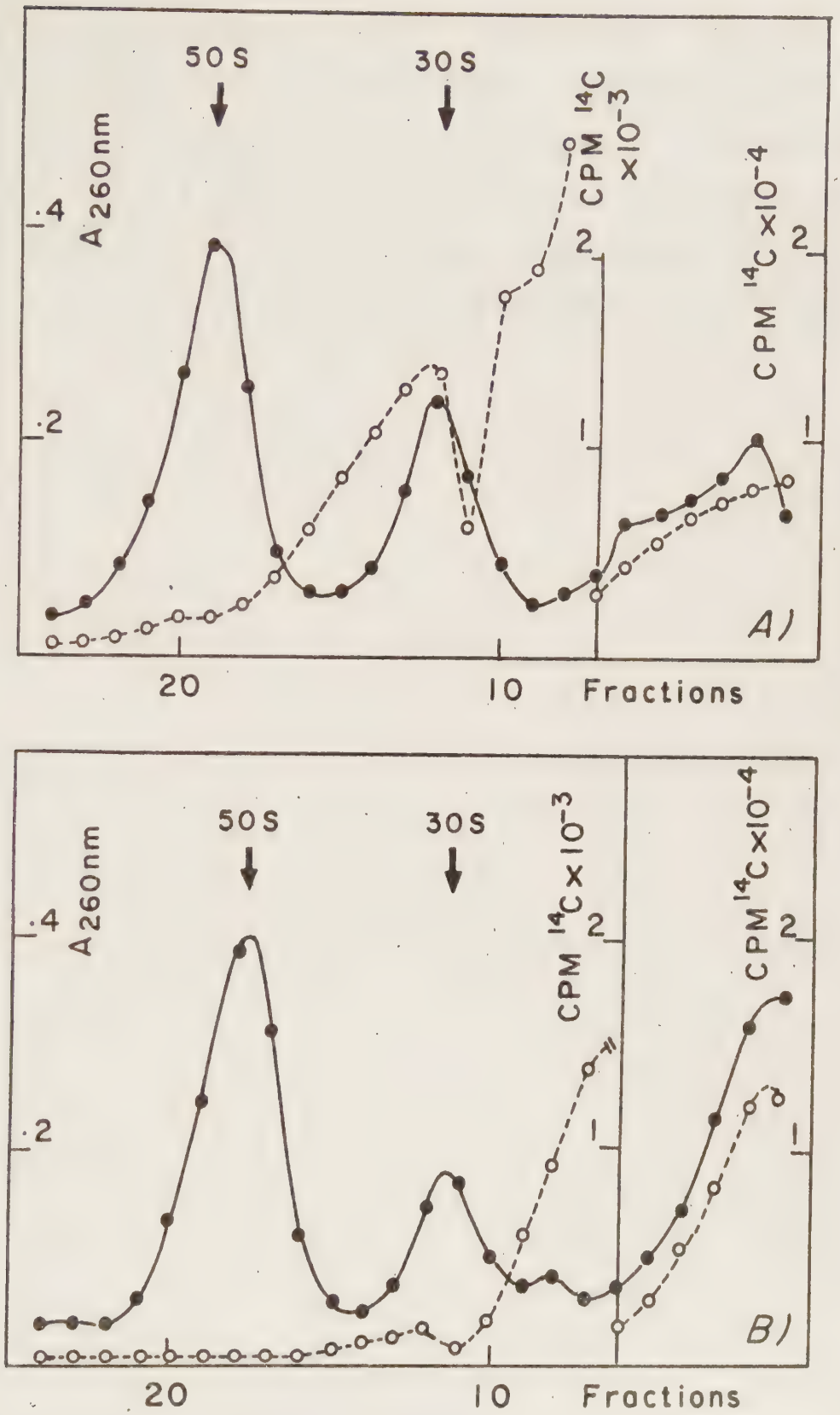
Afin de déterminer si l'accumulation de particules 28 S et 32 S résultait d'un défaut d'assemblage dû à la structure des RNA stables qui ont incorporé l'analogue ou à la formation de protéines ribosomiques anormales, nous avons testé la capacité de cellules carencées au phosphore à syn-

Figure 24 : ACTION DE LA RIBONUCLEASE SUR LES PARTICULES 5 FLUOROURACILES FORMEES AU COURS D'UNE RESTAURATION EN PHOSPHORE

A une culture d'Escherichia coli (souche ML 308) carencée en phosphore pendant 60 min., on ajoute du phosphate ($KH_2 PO_4$ 0.5 mM) et du 5 fluoro [^{14}C] Uracile (concentration finale 2.5 mCi/l, 16.4 mCi/mM). Après 15 min. d'incubation en présence du marqueur radioactif, les cellules sont récoltées et leur extrait est formé dans un tampon Tris HCl, pH 7.4, 5.10^{-3}M, contenant $MgCl_2$ 10^{-4}M. Une fraction de cet extrait cellulaire est incubée in vitro à 20° C en présence de ribonucléase pancréatique (EC.2.7.7.16) à une concentration de 10 µg/ml. Après 20 minutes d'incubation, l'échantillon ainsi traité est ramené à 4° C, puis immédiatement soumis à une centrifugation de 19.000 t/min. sur un gradient de saccharose 5 - 20 % pendant 15 heures. Le graphique A indique l'analyse de l'extrait cellulaire non traité par la ribonucléase, le graphique B l'extrait cellulaire traité par l'enzyme nucléolytique.

●——● Densité optique à 260 nm

O-----O Radioactivité 5 fluoro [^{14}C] Uracile TCA insoluble à 4° C.


50S
30S
A260nm
.4
.2
CPM 14C ×10-3
2
1
CPM 14C ×10-4
2
1
A)
20
10
Fractions
50S
30S
A260nm
.4
.2
CPM 14C x 10-3
2
1
CPM 14C x 10-4
2
1
B)
20
10
Fractions

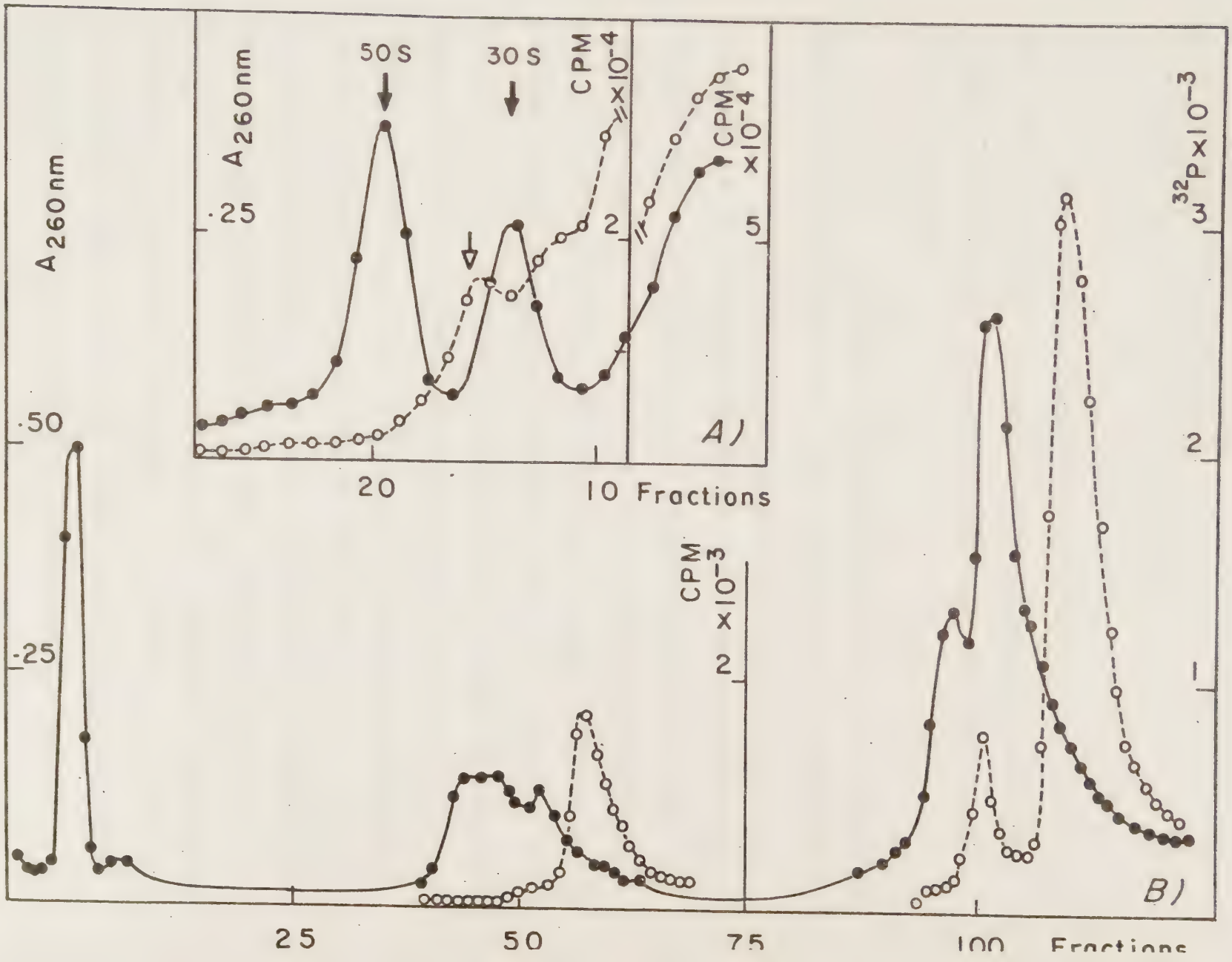
thétiser des particules 30 S et 50 S résistantes à la ribonucléase en présence de 5 fluorouracile. La figure 25 montre que de telles particules ne sont pas formées, le RNA contenant l'analogue suffit à empêcher la formation de sous-unités même dans les conditions où des protéines ribosomiques libres produits de traductions normales, sont présentes dans la cellule.

Figure 25 : PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES RNA CONTENUS DANS LES PARTICULES 32 S ACCUMULEES EN PRESENCE DE 5 FLUOROURACILE

A une culture d'Escherichia coli (ML 308) en phase exponentielle de croissance, on ajoute du 5 fluorouracile et de la thymidine à des concentrations finales de 5 mg/l. 2 minutes plus tard, on ajoute du $^{32}P\text{-}PO_4\ HNa_2$ (20 mCi/l). Après 30 min. d'incubation en présence du marqueur radioactif, les cellules sont récoltées, leur extrait est formé, puis analysé dans les conditions décrites à la figure 24. Les résultats de cette analyse sont présentés sur le graphique A. Une fraction du gradient de saccharose (indiquée par la flèche) contenant les particules 32 S est déprotéinisée en présence de RNA total de cellules non traitées par le 5 fluorouracile, puis analysée par chromatographie sur colonne de sérum albumine méthylée dans les conditions décrites à la figure 7. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le graphique B.

●——● Densité optique à 260 nm

O-----O Radioactivité ^{32}P. TCA insoluble à 4° C.


A260nm
.50
.25
25
50
75
100 Fractions
CPM x10⁻³
2
32P x10⁻³
3
2
1
B)
A260nm
.25
50S
30S
CPM x10⁻⁴
2
5
20
10 Fractions
A)

CONCLUSION ET DISCUSSION

Les résultats que nous venons de présenter s'inscrivent dans la thématique générale de la biosynthèse des sous-unités ribosomiques. Ils sont relatifs aux dernières étapes de ce processus.

Deux situations différentes nous ont permis d'approcher certains des mécanismes qui participent à ce phénomène d'assemblage des constituants ribosomiques. D'une part, la modification de la croissance bactérienne par addition d'un analogue de la phénylalanine, la parafluorophénylalanine, induit *in vivo* un ralentissement de la production des ribosomes. Cet effet entraîne l'accumulation de particules ribonucléoprotéiques précurseurs des sous-unités 30 S et 50 S. D'autre part, la carence en phosphore qui entraîne un accroissement du pool des protéines ribosomiques libres de la cellule permet la formation de particules ribonucléoprotéiques constituées de protéines ribosomiques synthétisées au cours de la croissance exponentielle et de RNA ribosomiques transcrits en absence de synthèse protéique active. Cette situation nous a permis d'étudier l'influence du pool des protéines ribosomiques libres sur la maturation des rRNA, l'importance de la méthylation des RNA ribosomiques sur l'assemblage *in vivo* des différents constituants du ribosome et la contribution des rRNA contenant du 5 fluorouracile dans la formation des particules 28 S et 32 S anormales accumulées *in vivo* par des cellules cultivées en présence de cet analogue de l'uracile.

Nos résultats obtenus à partir de l'action de la parafluoro-phénylalanine ont montré l'accumulation de sous-unités 30 S et 50 S sensibles à l'action ménagée de la ribonucléase pancréatique. Cette accumulation de sous-unités ne provient pas d'une anomalie dans le mécanisme d'initiation de la traduction, les cellules traitées ne présentent pas plus de sous-unités natives que les bactéries non traitées. Gierer et Gierer (20) ont montré l'existence de ces particules dans des cultures normales en croissance exponentielle. Ils ont montré que ces particules étaient incapables de s'associer pour former des monosomes, particularité que présentent aussi les précurseurs parafluorophénylalanine.

Ces observations semblent indiquer qu'il existe une étape ultime au cours de laquelle la sous-unité acquiert la capacité de s'associer à d'autres composants (grande sous-unité, messager) pour former une structure polysomique. Ceci vient d'être confirmé récemment (116). Sans éliminer la possibilité d'intervention de facteurs autres que les protéines ribosomiques, on peut penser que c'est le positionnement de ces protéines qui confère aux particules ribonucléoprotéiques les propriétés des sous-unités ribosomiques. Au niveau de la sous-unité 30 S, deux protéines nous paraissent pouvoir participer à cette étape : les protéines S 3 et S 21. On sait que la fixation de la protéine S 21 nécessite une extrémité 3'OH du RNA 16 S correcte (113). S 3 et S 21 sont les protéines qui se fixent parmi les dernières au cours de la reconstitution in vitro de la particule 30 S; de plus, l'utilisation des anticorps a révélé qu'elles étaient proches de la zone d'interface de la sous-unité (114). Ces deux protéines sont également nécessaires à la fixation du tRNA initiateur (115).

Enfin, on sait que la quantité relative de S 21 varie en fonction du taux de croissance cellulaire (59); on peut donc formuler l'hypothèse qu'au cours d'une croissance linéaire S 21 serait limitante dans le processus d'assemblage de la sous-unité 30 S.

Il est intéressant de noter que selon les travaux effectués à partir de cellules normales en croissance exponentielle, les précurseurs de la sous-unité 30 S ne contiennent que 2 % du RNA du type 16 S présent dans la bactérie (116). De plus, deux précurseurs ribonucléoprotéiques semblent perceptibles, p1 30 S et p2 30 S de coefficient de sédimentation 21-25 S et 30 S respectivement. La forme la plus abondante semble être la forme p2 30 S (116). Notons que l'accumulation de ce précurseur est très largement dépendante du taux de croissance cellulaire. La vitesse de maturation des sous-unités ribosomiques est d'autant plus élevée que le taux de croissance est faible (117).

L'accumulation en présence de PFP de particules 50 S incapables de s'associer aux sous-unités 30 S pour former des monosomes pourrait résulter de l'absence sur ces particules de la protéine L 12. Cette protéine fait défaut dans les particules 43 S (118); de plus, les variations dans les taux de synthèse en fonction des conditions de croissance cellulaire sont différentes de celles des autres protéines de la sous-unité 50 S (6). Cette protéine est "fractionnaire" dans les cellules cultivées sur milieu "minimum", et "unitaire" dans les bactéries en croissance sur milieu "riche" (6).

Nous avons, par ailleurs, décrit deux types de particules 43 S, les unes accumulées en présence de parafluorophénylalanine, les autres formées en absence de synthèse protéique due à une carence en méthionine (souche EA 2, précarencée en phosphore). Les premières sont sensibles à l'action du DNP; les secondes sont résistantes. En fait, la figure 26 montre qu'il existe chez les cellules EA 2 des particules 40-45S sensibles à l'action du DNP. L'hétérogénéité de ces particules 45 S pourrait résulter d'une différence de composition en protéines.

Au cours de notre travail relatif à la synthèse des sous-unités ribosomiques chez des cellules précarencées en phosphore, nous avons pu étudier deux mécanismes importants qui dominent l'évolution des précurseurs de ces sous-unités : la maturation des rRNA et l'intégration du RNA 5 S dans la sous-unité 50 S.

Le RNA p 23 S doit subir les modifications postranscriptionnelles que nous avons rappelées dans l'introduction à ce chapitre. Bien que nous ne possédions que peu d'informations concernant cette maturation, nos expériences semblent montrer que l'absence de méthylation entraîne la formation de particules 45 S. L'accumulation de ce précurseur ribonucléoprotéique ne peut résulter d'une sous-méthylation du RNA 5 S (celui-ci ne possédant pas de groupements méthyls) ou des protéines L 1, L 3, L 8, L 9, L 5, L 7, L 18, L 11, L 12, L 33 qui sont normalement méthylées (119-122). En effet, dans nos expériences, celles-ci proviennent de ribosomes formés au cours de la phase exponentielle de croissance. Donc tout donne à penser que la

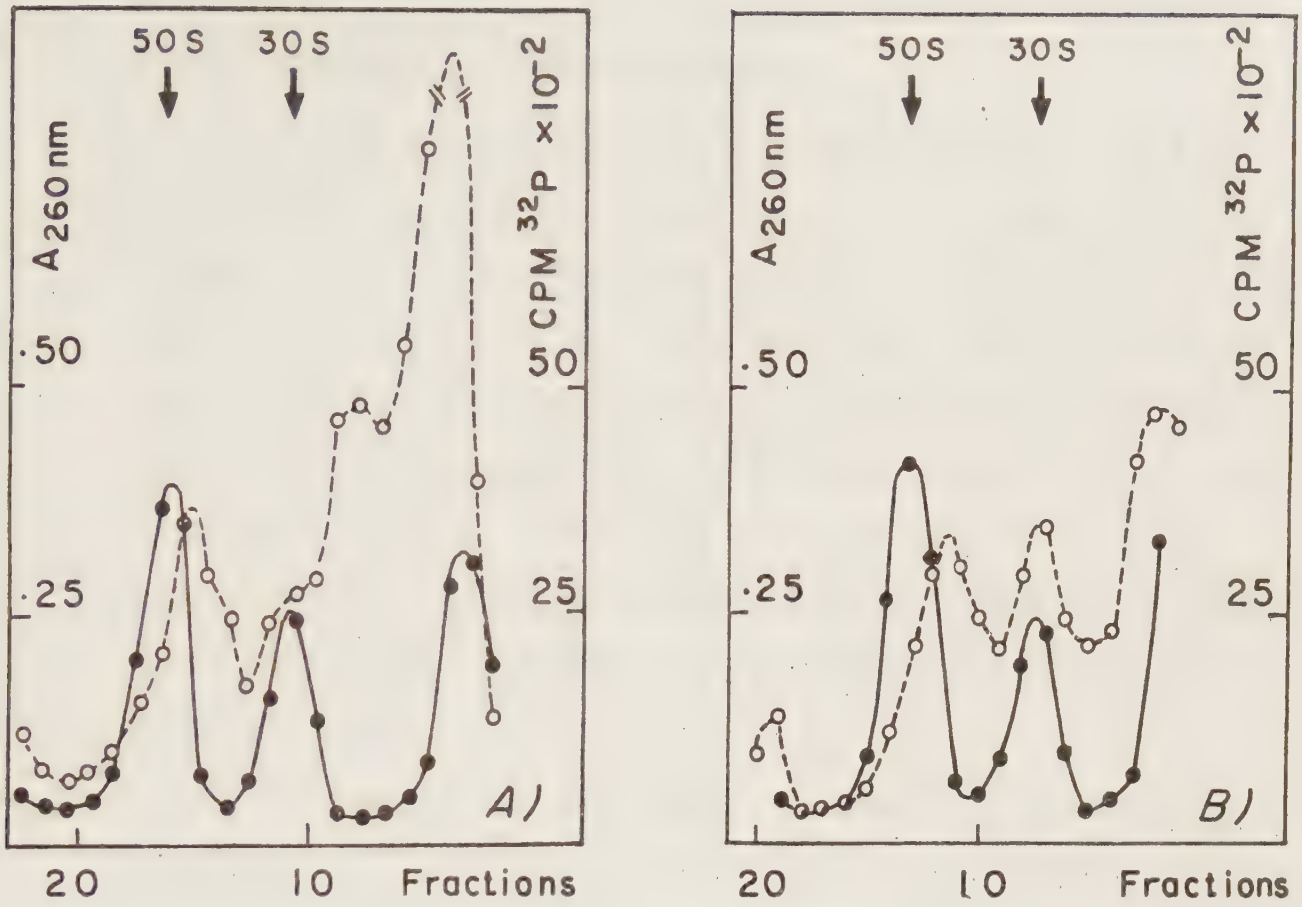


Figure 26 : ACTION DU DNP SUR LES PARTICULES FORMEES PAR ESCHERICHIA COLI DE LA SOUCHE EA_2 CARENCEE EN METHIONINE AU COURS DE LA RESTAURATION EN PHOSPHORE

A une culture d'Escherichia coli (souche EA_2) carencée 30 min. en phosphore, puis 30 min. en phosphore et en méthionine, on ajoute 0.5 mM de KH_2PO_4 et du ^{32}P-PO_4HNa_2 (20 mCi/l). Après 15 min. d'incubation en présence du marqueur radioactif, on prélève une moitié de la culture dont on récolte les cellules. A l'autre moitié, on ajoute du DNP 5 mM, H 7.5. Après 90 minutes de traitement par le DNP, les cellules sont récoltées. Les deux extraits cellulaires sont formés et analysés dans un tampon Tris HCl 5.10^{-3}M pH 7.4; Mg Cl_2 10^{-4}M. Les extraits sont analysés sur gradient de saccharose 5 - 20 %. Les graphiques A et B présentent l'analyse des extraits de cellules non traitées et traitées par le DNP respectivement.

●——● Densité optique à 260 nm

O-----O Radioactivité ^{32}P TCA insoluble à 4° C.

méthylation du RNA 23 S représente une phase nécessaire à l'assemblage de la sous-unité 50 S.

Les travaux relatifs à l'intégration du RNA 5 S dans un précurseur ribonucléoprotéique de la sous-unité 50 S indiquent que le RNA est présent dans les particules 32 S (21, 118) et 43 S (21, 68, 118, 123). Les résultats montrent qu'il existe en quantité stoéchiométrique avec le RNA 23 S dans toutes les particules ribonucléoprotéiques précurseurs de la sous-unité 50 S que nous avons isolées. De plus, il existe sous une forme moléculaire dont le comportement chromatographique sur colonne de MAK est analogue à celui du RNA 5 S mature.

L'étude des précurseurs du RNA 5 S a permis d'en déterminer trois formes contenant un à trois nucléotides excédentaires du RNA 5 S normal, situés à son extrémité 5'P :

la forme I : pApUpUpUpG....

la forme II : pUpUpUpG....

la forme III : pUpUpG....

le 5 S normal: pUpG....

Ces trois formes qui sont présentes dans le surnageant de bactéries traitées par le chloramphénicol (124), ou accumulées par des souches Rel A^- carencées en acide aminé (125), ont des comportements chromatographiques sur colonne de MAK différents. Les formes I et II sont retenues plus fortement que la forme III qui est éluée avec les molécules de RNA 5 S mature (72). Si notre analyse ne permet pas de différencier la forme III du RNA 5 S normal, le fait que des bactéries traitées par le chloramphénicol accumulent des sous-unités

50 S dépourvues de RNA 5 S ayant les propriétés chromatographiques des formes précurseurs I et II, montre sans ambiguïté que la maturation de ces RNA a pu, au moins partiellement, avoir lieu en présence de l'antibiotique. La participation du RNA 5 S dans l'assemblage de la sous-unité 50 S requiert donc une coupure de l'extrémité 5' des précurseurs I et II du RNA 5 S. De plus, cette coupure peut avoir lieu in vivo en absence de synthèse protéique active mais en présence d'un pool de protéines ribosomiques libres.

Un point délicat de la biosynthèse de la sous-unité 30 S concerne le processus de méthylation du RNA 16 S et les coupures nucléolytiques des formes précurseurs de ce RNA (RNA 17,5 S, RNA 17 S). Le taux de méthylation du RNA 17,5 S équivaut à un peu moins de 30 % de celui du RNA 16 S et cette première phase de méthylation ne nécessite pas que la molécule de RNA soit intégrée dans une structure ribonucléoprotéique (126, 66). Ceci n'exclut pas pour autant qu'in vivo cette première phase de méthylation du RNA résulte de l'action de méthylases spécifiques sur des structures ribonucléoprotéiques.

Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que la seconde phase de méthylation a lieu tardivement au cours de la biosynthèse. Certains travaux réalisés in vitro (127) sembleraient indiquer que cette méthylation pourrait se produire dès lors que la sous-unité aurait été intégrée dans une structure polysomique.

Nos résultats indiquent que les dernières étapes nécessaires à la formation de particules 30 S nécessite au préalable que soit réalisé ce phénomène de méthylation.

De plus, nos travaux semblent montrer que cette méthylation est obligatoirement requise pour la transformation du RNA 17 S en RNA 16 S. On sait, par ailleurs, que la méthylation du RNA 16 S est rendue possible dès lors que celui-ci est associé aux protéines S 4, S 8, S 16, S 17, S 15, S 18, S 6 et S 11, alors que l'ensemble des protéines S 9, S 14, S 10 et S 3 inhibe cette modification (128). Cet effet inhibiteur est augmenté par la présence des protéines S 20 et S 21.

L'ensemble de ces informations peut nous amener à préciser une étape de la biosynthèse de la sous-unité 30 S au cours de laquelle la formation du site d'action des enzymes nucléolytiques nécessaires à la coupure de l'extrémité 3'OH par la ribonucléase M (127, 129), est dépendante de la méthylation du RNA ribosomique. L'addition de certaines protéines et, notamment, de la protéine S 3 dont l'association nécessite la présence des protéines S 10 et S 5, devrait être postérieure au phénomène de méthylation. Les protéines S 3 et S 10, nous l'avons rappelé, inhibent la méthylation du RNA (128). Dans des conditions où des protéines ribosomiques libres sont présentes dans la cellule, si la méthylation est possible (cas de la souche PAI carencée en phosphore, puis en arginine), il y a formation de la sous-unité 30 S. Si la méthylation ne peut avoir lieu (cas de la souche EA 2 carencée en phosphore puis en méthionine), on ne forme pas la sous-unité. De plus, on sait que la protéine S 3 ne peut s'associer au ribosome que si le RNA est sous la forme 16 S. Si le RNA est sous la forme 17 S la protéine est absente et il ne peut y avoir d'association avec la sous-unité 50 S (130).

Cette hypothèse est en accord avec les observations selon lesquelles *in vivo*, le RNA ribosomique existe à l'état de precurseur pendant de nombreuses étapes qui concourent à son association avec des protéines ribosomiques. Par ailleurs, les f a i t s selon lesquels la vitesse de reconstitution *in vitro* de sous-unité 30 S soit plus rapide quand le RNA 17 S remplace le RNA 16 S (131) et que le processus d'assemblage requiert moins d'énergie *in vivo* qu'*in vitro* (132) semblent confirmer cette proposition.

Les hypothèses que nous formulons ici attirent un certain nombre de remarques. L'une d'elles est relative à l'existence de particules ribonucléoprotéiques contenant du RNA 17 S et qui seraient présentes dans les structures polysomiques (127). Rien ne peut écarter le caractère artéfactuel d'une telle localisation, comme semblent l'indiquer les études cinétiques de Lindahl (116). Le fait que le RNA 17 S puisse *in vitro* être transformé en RNA 16 S sans pour autant subir une méthylation complète (127) ou que l'on ait pu isoler des particules éthionine (92, 133) dont le RNA présente un coefficient de sédimentation 16 S, s'ils confirment que les deux phénomènes, méthylation et coupure du précurseur 17 S, peuvent être dissociés, ne sont pas moins contradictoires avec nos propositions. On ne peut pas évoquer pour expliquer cette contradiction que la conformation du ribosome nécessaire à la coupure du RNA 17 S, soit assurée par une substitution de la méthionine par l'éthionine, étant donné que celle-ci n'est pas fixée sur le RNA. Contrairement à ce qui existe chez les eucaryotes, il n'y a pas chez *Escherichia coli* possibilité de formation de S-Adénosyl éthionine. On est donc amené à conclure que la formation de ces particules éthionine n'est pas en tous

points analogue au processus normal de la biosynthèse de la sous-unité 30 S.

On peut, en effet, remarquer que la formation de ribosomes actifs à partir de la particule 21 S (contenant le RNA 17 S) isolés de cellules en croissance exponentielle, nécessite la présence dans le milieu de reconstitution, des protéines 30 S et requiert également des conditions favorables à la méthylation, telles que la présence conjointe d'un extrait cellulaire, d'ATP et de S-adenosylméthionine (118). De plus, on sait que la méthylase responsable de la méthylation complète de l'extrémité 3'OH du RNA 16 S ne peut pas agir in vitro, si toutes les protéines ribosomiques (et, notamment, les protéines S 3, S 9, S 10, S 14 et S 21) sont présentes sur la particule (128). Il semble donc que les observations selon lesquelles des particules ribonucléoprotéiques contenant un RNA sous méthylé peuvent participer à une structure polysomique, ne soient certainement pas conformes au processus normal de la traduction.

Les précurseurs des RNA ribosomiques macromoléculaires sont les constituants normaux qui participent à l'assemblage des sous-unités ribosomiques. Certaines des modifications postranscriptionnelles de ces RNA sont liées à leur participation à des composés ribonucléoprotéiques précurseurs normaux des sous-unités ribosomiques. Les protéines ribosomiques jouent donc un rôle fondamental dans la constitution des sites d'action des enzymes responsables des transformations nécessaires à la maturation des RNA. Nous avons montré que cette maturation peut avoir lieu en absence de synthèse pro-

téique active, à la condition que les cellules disposent d'un pool de protéines ribosomiques libres suffisant. Mais la maturation du RNA ne résulte pas exclusivement de son assemblage avec des protéines ribosomiques, elle exige la participation d'enzymes nucléolytiques et de méthylation. Nous avons pu montrer que certaines des enzymes nucléolytiques ne peuvent normalement fonctionner que si la méthylation des RNA est possible.

Le processus de méthylation est donc un élément de régulation important dans le fonctionnement de la traduction. En effet, la méthylation intervient directement dans les fonctionns enzymatiques du ribosome lui-même : les protéines L 11 et L 15, L 18, L 7, L 12 participent respectivement au site de la peptidyltransférase et à l'activité ATPasique ou GTPasique de la sous-unité 50 S ; la méthylation de l'extrémité 3'OH du RNA 16 S est normalement nécessaire à l'initiation de la synthèse protéique. L'absence de méthylation empêche dans les conditions physiologiques normales les transformations conformationnelles requises pour la synthèse des sous-unités ribosomiques.

CHAPITRE II

PARTICIPATION DES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S A LA TRADUCTION DES RNA MESSAGERS NATURELS

La traduction qui conduit à la substitution rigoureuse d'une information exprimée (protéine) à une information contenue (RNA), nécessite le fonctionnement régulé d'une pluralité de sites actifs. Ce mécanisme fait du ribosome un organite polyenzymatique, lieu d'expression des différentes réactions auxquelles participe l'ensemble des molécules nécessaires à la synthèse d'une protéine.

Dès lors que le ribosome est défini comme étant constitué de 55 protéines et de trois RNA, on comprend la complexité de son étude dans le champ de la biologie moléculaire.

La méthodologie utilisée fait appel à l'étude de l'influence de tel ou tel constituant sur une ou plusieurs réactions fragmentaires qui participent à l'ensemble coordonné du processus de traduction. Les limites inhérentes à une telle démarche expérimentale se trouvent compensées par la pluralité des techniques utilisées.

Un premier ensemble de techniques a permis de déterminer les conséquences de la présence de telle protéine sur la traduction. A cet ensemble se réfèrent les études de reconsti-

tution de Nomura (135), celles relatives à l'influence des "Split proteins" sur les particules obtenues par traitement des sous-unités 30 S au chlorure de cesium (136) et l'addition de protéines fractionnaires (137, 138).

D'autres auteurs ont fait appel aux techniques de marquage d'affinité basées sur l'association de certains produits (iodoamphénicol, bromoacetylphe - tRNA...) à un site fonctionnel du ribosome. Cette association mime celle d'un ligand naturel (139).

Nombreux sont ceux qui ont fondé leurs hypothèses sur la topologie de la sous-unité. Ils utilisent des réactifs bifonctionnels capables d'unir des protéines ribosomiques à des facteurs solubles radioactifs, les facteurs d'initiation par exemple (140, 141). D'autres analysent la protection des protéines de l'organite à l'action de la trypsine, une fois qu'un tRNA est fixé sur le ribosome (142).

Des travaux récents ont utilisé la spécificité d'action de la colicine E3 sur la coupure de l'extrémité 3'OH du RNA 16 S (113). L'analyse de mutants affectés dans la sensibilité des sous-unités ribosomiques vis-à-vis de nombreux antibiotiques, permet de déterminer l'influence de la protéine modifiée par la mutation (143) ou de telle modification post-transcriptionnelle du RNA ribosomique (144) dans l'activité de l'organite.

Certaines réactions ont pu être étudiées à partir de sites actifs isolés du complexe normal ribosome-mRNA-aminoacyltRNA-peptidyltRNA-facteurs solubles. C'est le cas de la "fragment réaction" qui a permis l'étude de l'activité de la

peptidyl transferase (145). Récemment a pu être mis en évidence un complexe RNA 5 S protéines responsable d'une activité ATPasique et GTPasique (146).

Il faut signaler les données physiques relatives aux modifications de la conformation du ribosome en cours de traduction (147) ou à la détermination des sites ribosomiques reconnus par l'aminoacyltRNA et les facteurs d'élongation (139).

Enfin, l'utilisation des anticorps dirigés contre les protéines ribosomales purifiées a permis de définir la participation de ces protéines à différentes étapes de la traduction (115). L'emploi de ces anticorps est rendu possible par le fait que toutes les protéines du ribosome leur sont accessibles in situ (148) et que la spécificité de motifs antigéniques de chaque protéine ribosomique est très grande. En effet, aux seules exceptions des protéines S 20 et L 26 d'une part, et L 7 et L 12 d'autre part, il n'y a pas de réaction croisée (149, 150). J.C. Lelong et coll. (115) ont étudié l'influence des fragments Fab (obtenus par traitement à la papaïne des IgG) dirigés contre les protéines de la sous-unité 30 S, sur la traduction du poly U et les fixations du fMet tRNA et du Phe tRNA (dépendante du EF Tu) sur la sous-unité 30 S et le monosome 70 S respectivement. Nous nous sommes proposés d'établir, à l'aide de cette même technique, la participation des différentes protéines de la sous-unité 30 S dans la traduction des messagers naturels (mRNA tardifs de phage T4 et RNA du phage R 17).

1. - EFFETS DES FRAGMENTS Fab SUR LA TRADUCTION DU RNA TARDIF DU PHAGE T4

Nous avons déterminé la cinétique d'incorporation de l'acide aminé marqué (valine ^{14}C) dans les protéines, pour chaque concentration de fragments Fab utilisée. La figure 27a est relative à l'effet du Fab provenant d'un anticorps dirigé contre la protéine S 9. L'incorporation est linéaire pendant les vingt premières minutes, puis tend vers un plateau. Le facteur limitant de cette réaction est la dégradation du RNA messager. La figure 27b montre que pour une espèce de Fab donnée, le taux d'inhibition de la synthèse protéique est le même après 10, 20 ou 30 minutes d'incorporation. Le fragment Fab a donc le même effet sur l'ensemble de la cinétique de la synthèse protéique. Ce résultat a été obtenu avec tous les fragments Fab testés dans la traduction du mRNA tardif du phage T4.

L'étude de la neutralisation de 20 protéines de la sous-unité 30 S révèle que toutes les protéines ne participent pas avec la même efficacité aux fonctions nécessaires à la traduction du mRNA (figure 28). Si l'on compare l'effet des différents Fab pour un rapport $Fab_{A280\ nm}$ équivalent sous-unité 30 $S_{A260\ nm}$ égal à 1, on remarque que la neutralisation de la protéine S 7 est sans effet sur la traduction. Les Fab dirigés contre les protéines S 9, S 11, S 14, S 18, S 19, S 20 et S 21, bloquent complètement la synthèse protéique, alors que ceux formés contre les protéines S 1, S 6, S 10, S 13, S 4, S 12 et

Figure 27 : EFFETS DES Fab DIRIGES CONTRE LA PROTEINE S 9 SUR LA CINETIQUE D'INCORPORATION DE LA ^{14}C VALINE DANS LES PROTEINES AU COURS DE LA TRADUCTION DES RNA TARDIFS DU PHAGE T4

Les immunoglobulines et leurs fragments monovalents (Fab) dirigés contre la protéine S 9 ont été obtenus selon les techniques décrites par Putman et coll. (355) et par Maschler (356).

Les ribosomes 70 S ont été préparés par traitement dans le tampon Tris HCl, 10 mM, pH 7.5; NH_4 Cl 1 M; acétate de magnésium, 10 mM; β-mercapto-éthanol, 7 mM. Le mRNA tardif du bactériophage T4 a été obtenu après 25 minutes d'infection des cellules par le phage selon la technique décrite par Gesteland et coll. (357). Le surnageant S 150 est préparé après centrifugation d'un extrait S 30 centrifugé 3 heures à 150.000 g. L'extrait brut de facteurs d'initiation est obtenu selon les techniques que nous avons décrites par ailleurs (358).

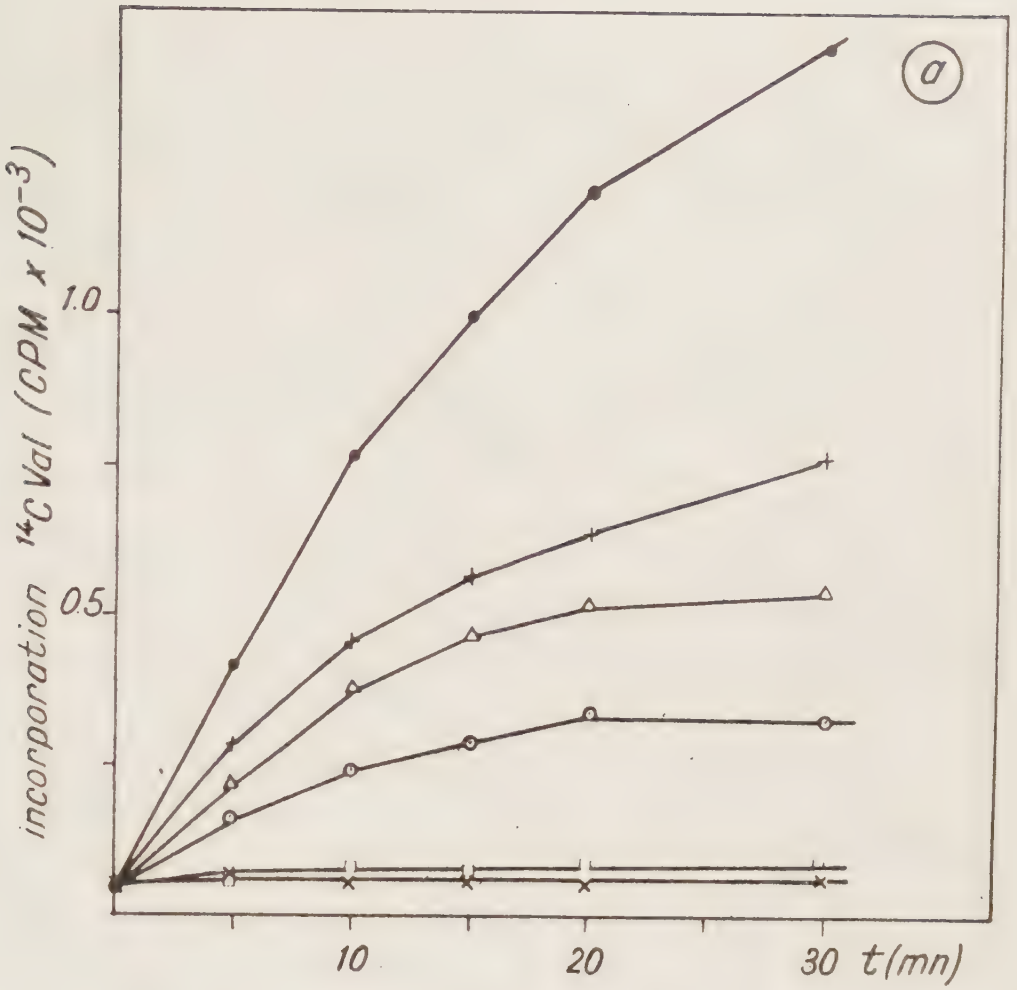
La synthèse protéique dirigée par le mRNA tardif du phage T4 a été effectuée dans les conditions proposées par Salser et coll. (359) : 100 µl de milieu d'incubation contiennent : Tris HCl, pH 7.8, 50 mM; NH_4Cl, 60 mM; acétate de magnésium, 8 mM; dithiothreitol, 2 mM; ATP, 1.5 mM; GTP, 0.1 mM; PEP, 6 mM; pyruvate kinase, 10 µg; un mélange complet d'acides aminés moins la valine (0.12 mM chacun); ^{14}C valine (22 µCi/µmoles), 0.02 mM; mRNA tardif du phage T4 : 80 µg; surnageant S 150 et facteurs d'initiation en quantités saturantes; 0.5 unités A260 nm de ribosomes 70 S.

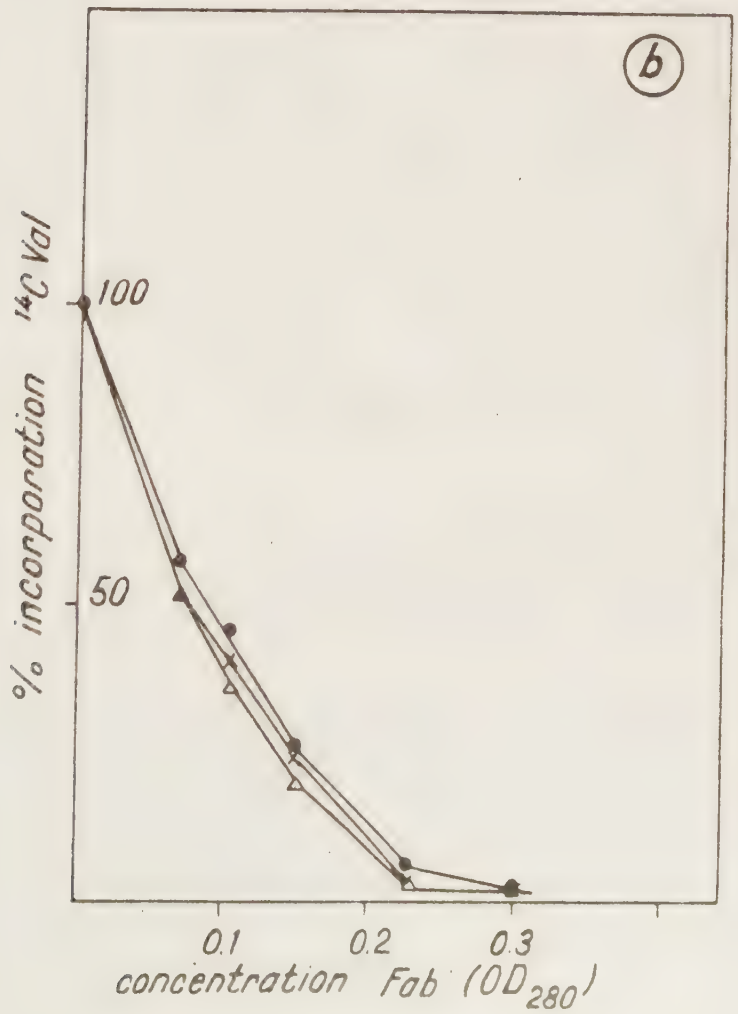
Les fragments Fab dirigés contre la protéine S 9 ont été dissous dans un tampon TMN 8 dilué au 1/4 (TMN 8 : Tris HCl, 50 mM, pH 7.5; NH_4Cl 80mM; acétate de magnésium 5 mM), puis centrifugés 2 minutes à 14.000 g dans une centrifugeuse "microfuge" Beckman afin d'éliminer le matériel insoluble. La densité optique du surnageant est mesurée à 280 nm. Des quantités variables de solution de Fab sont préincubées en présence de 0.5 unités A260 nm de ribosomes 70 S. L'ensemble de ces manipulations est effectué à la température du laboratoire. Les préincubations ribosomes - Fab sont effectuées dans un volume constant, quelle que soit la quantité de Fab ajoutée (complémentation pour des volumes variables du tampon TMN 8 dilué au 1/4). Ce mélange Fab-ribosomes est ensuite testé dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4.

Des prélèvements de 10 µl sont effectués à différents temps et précipités en présence de sérum albumine par du TCA 5 %. La radioactivité TCA insoluble à chaud est mesurée.

Le graphique A représente la cinétique d'incorporation de la ^{14}C valine obtenue avec des concentrations de Fab anti S 9 variables : ●———● contrôle, +———+ 0.07 unités A280 nm; Δ———Δ 0.11 unités A280 nm; O———O 0,14 unités A280 nm; ——— 0,22 unités A280 nm; X———X 0.28 unités A280 nm.

Le graphique B représente les courbes d'inhibition de la traduction pour les Fab dirigés contre la protéine S 9 pour des temps différents d'incubation : ●———● après 10 minutes de traduction de T4; X———X après 20 minutes; Δ———Δ après 30 minutes.


a
incorporation ^{14}C Val (CPM x 10^{-3})
1.0
0.5
10
20
30
t(mn)


b
% incorporation ^{14}C Val
100
50
0.1
0.2
0.3
concentration Fab (OD_{280})

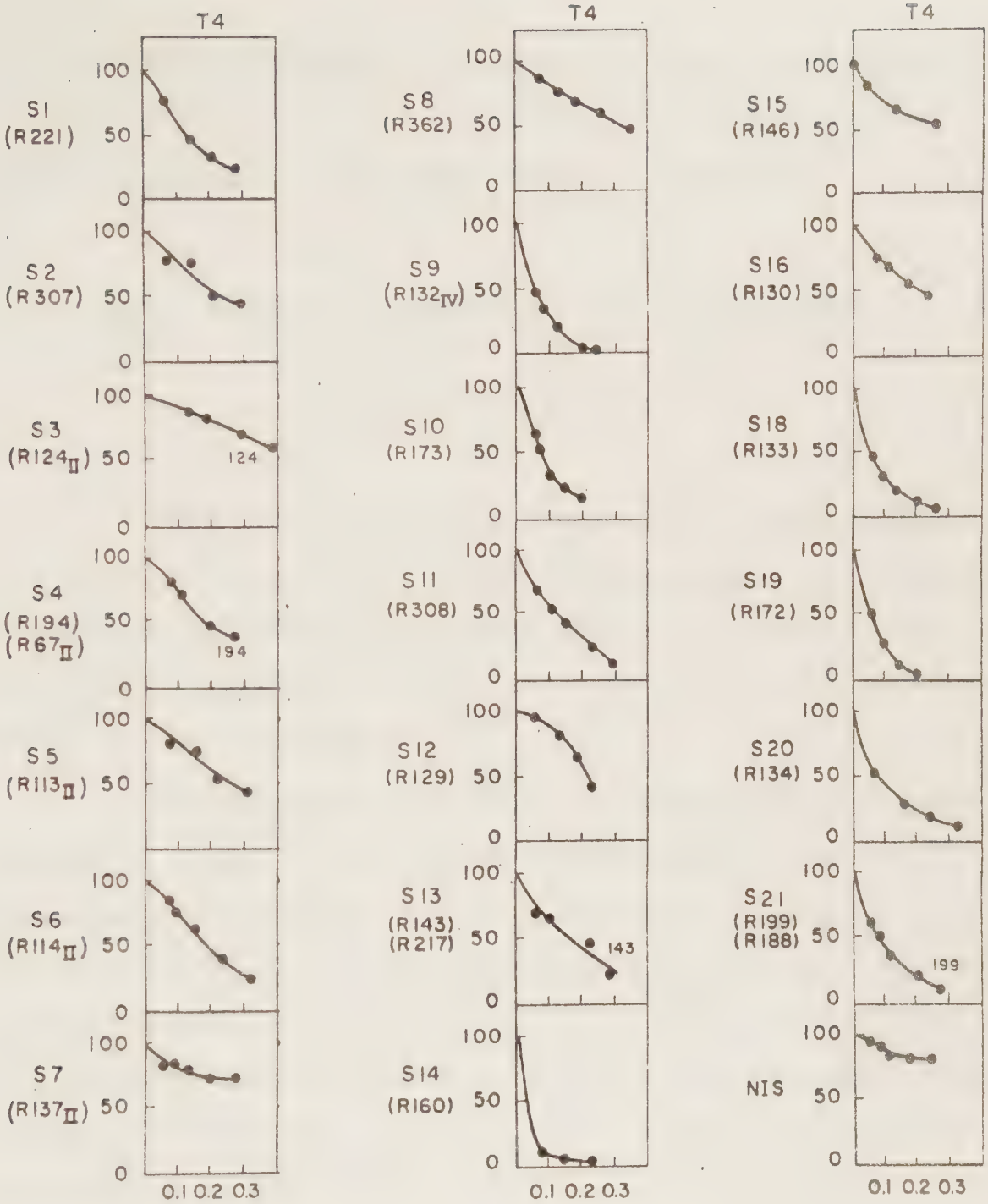


Figure 28 : EFFETS DES Fabs DIRIGES CONTRE LES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S, SUR LA TRADUCTION DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4

Les conditions sont celles décrites dans la figure 27. Nous avons utilisé dans chaque expérience 0.4 unités A260 nm de ribosomes 70 S. 100 % représente l'activité de la synthèse protéique sans addition de fragment Fab. L'activité de la traduction dirigée par les mRNA tardifs du phage T4 a été déterminée après 10 minutes d'incubation à 37° C. Les chiffres portés entre parenthèses indiquent les différents lots de sérum qui ont été utilisés pour la préparation des Fab dirigés contre chaque protéine de la sous-unité 30 S. Les abscisses indiquent la concentration en Fab exprimée en unité A280 nm pour 0.4 unités A260 nm de ribosomes 70 S. Les préparations des sérums et des Fabs dirigés contre les protéines de la sous-unité 30 S ont été effectuées par le laboratoire du Dr. Stöffler.

S 16 l'inhibent fortement. En revanche, les anticorps contre les protéines S 2, S 3, S 5, S 8 et S 15 n'affectent que faiblement la traduction des mRNA tardifs du phage T4.

2. - EFFETS DES FRAGMENTS Fab SUR LA TRADUCTION DU RNA DU PHAGE R 17

Nous avons observé que l'effet de la concentration des fragments Fab sur la cinétique d'incorporation de la valine ^{14}C dans les protéines synthétisées sous la direction du RNA de R 17 était identique à celui décrit dans le système de traduction du RNA tardif de T4.

Les résultats relatifs à ces expériences sont reportés dans la figure 29. On observe une inhibition totale par les fragments Fab dirigés contre les protéines S 9, S 11, S 14, S 18, S 19, S 20, S 21 et S 10, et une inhibition forte par les fragments anti-S 1, S 4, S 6, S 12, S 13, S 16. Les anticorps dirigés contre les protéines S 2, S 3, S 5 et S 15 n'ont que peu d'effet. Les Fab formés contre S 7 et S 8 sont sans effet sur la traduction du RNA de R 17.

Ces résultats sont analogues à ceux obtenus avec le RNA de T4. Une seule différence est observée au niveau de la protéine S 8. Alors que le Fab anti-S 8 inhibait faiblement la traduction des RNA tardifs du phage T4, la synthèse protéique dirigée par le RNA de R 17 n'est pas affectée du tout.

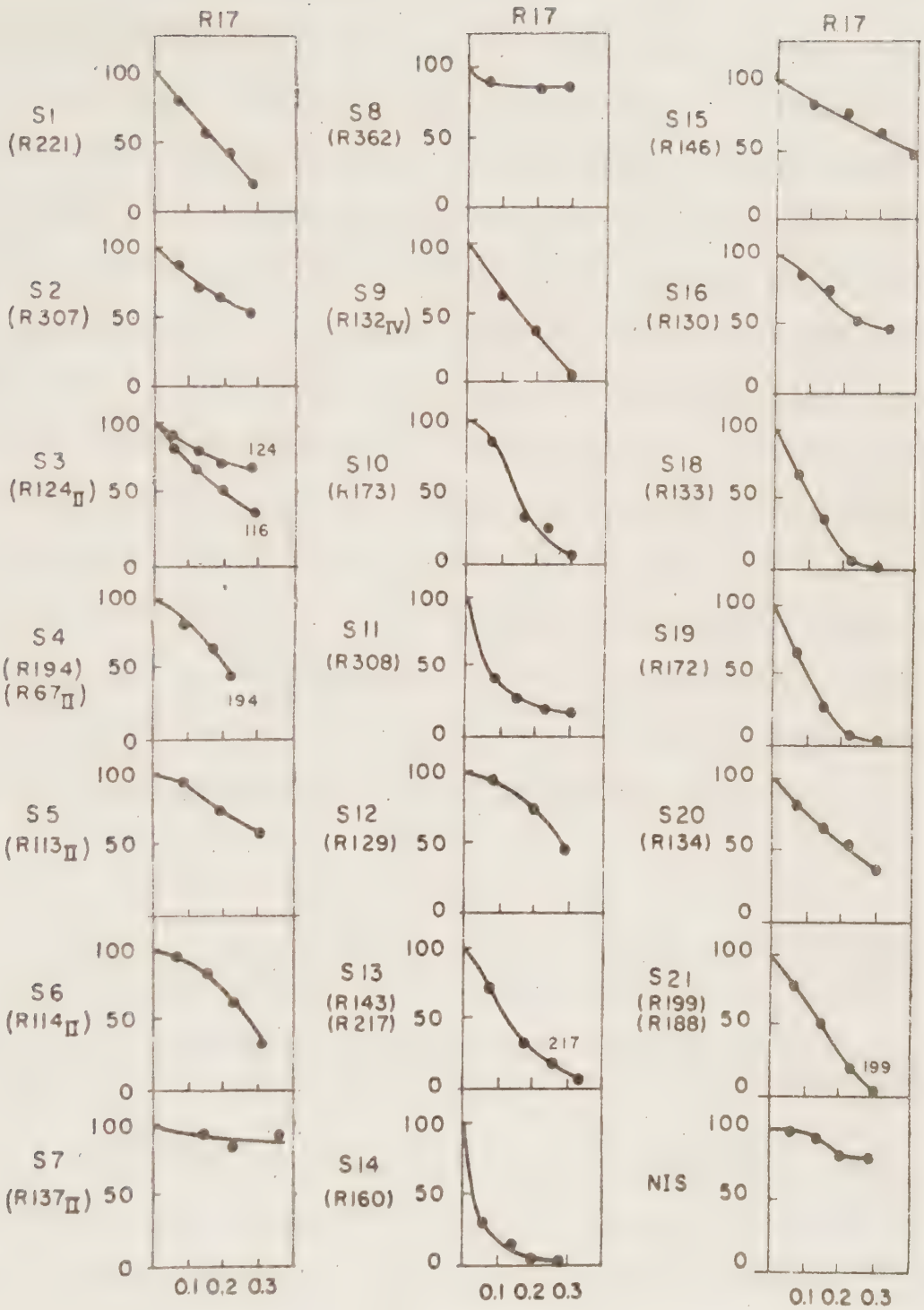


Figure 29 : EFFETS DES Fab DIRIGES CONTRE LES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S, SUR LA TRADUCTION DU RNA DU PHAGE R 17

Les conditions sont celles décrites dans la figure 28. Le RNA de R 17 a été utilisé à la concentration de 40 µg/100µl de milieu réactionnel. Chaque expérience a été effectuée en présence de 0.4 unités A260 nm de ribosomes 70 S.

L'absence d'inhibition par addition d'un Fab doit être interprétée avec prudence. Si, comme nous l'avons rappelé, StÖffler et coll. (148) ont montré que toutes les protéines de la sous-unité 30 S sont accessibles in situ aux Fab dirigés contre elles, on ne peut toutefois éliminer l'hypothèse selon laquelle l'interaction Fab-protéine n'affecte pas le ou les sites actifs de cette protéine impliqués dans la réaction testée. Cette réserve est complétée par les différentes remarques plus générales relatives à l'utilisation de cette technologie immunologique, que nous formulons dans le paragraphe 4 de ce chapitre. Dans le cas particulier des Fab dirigés contre les protéines S 7 ou S 8, pour lesquels nous observons peu ou pas d'effet sur la traduction, il a été montré par ailleurs qu'ils présentaient un effet inhibiteur dans la réaction de couplage transcription traduction du DNA de λ plac (151).

3. - PROPOSITIONS POUR UNE CLASSIFICATION DES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S EN RELATION AVEC LEURS FONCTIONS

Nous avons, dans le tableau VI associé nos résultats à ceux obtenus par Lelong et coll. (115) dans l'étude des effets des Fab dirigés contre les protéines de la sous-unité 30 S, vis-à-vis de la traduction de poly U à haut magnésium (18 mM), de la fixation du Phe tRNA dépendante de EF Tu et de celle du fMet tRNA sur les sous-unités 30 S. La comparaison entre ces différents résultats est rendue possible par le fait que nous avons utilisé le plus souvent les Fab obtenus à partir des

TABLEAU VI

EFFETS DES FRAGMENTS MONOVALENTS Fab DIRIGES CONTRE LES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S SUR LA TRADUCTION ET LA FIXATION DES AMINO-ACYL tRNA

Protéine neutralisée	Sérum N°	Traduction			Fixation de l'aminoacyl tRNA à la sous-unité 30 S (1)	
		T4	R 17	Poly U (1)	Phe tRNA (+ 50 S)	fMet tRNA (- 50 S)
S1	221	++	++	++	+	+
S2	307	+	+	++	+	+
	65	ND	ND	++	-	+
S3	124	+	+	++	ND	ND
	116	+	+	++	++	++
S4	194	++	++	++	ND	ND
	67	ND	ND	+	-	-
S5	113	+	+	+	-	+
S6	114	++	++	+	-	+
S7	137	-	-	+	-	-
S8	362	+	-	++	++	-
S9	132	++	++	++	++	+
S10	173	++	++	++	+	++
S11	308	++	++	++	++	-
S12	129	++	++	+	-	+
S13	143	++	ND	++	+	+
	217	ND	++	ND	ND	ND
S14	160	++	++	+	+	+
S15	146	+	+	+	-	-
S16	130	++	++	++	-	-
S18	133	++	++	++	++	-
S19	172	++	++	+	+	+
S20	134	++	++	++	+	+
S21	199	++	++	+	ND	ND
	188	ND	ND	ND	++	++

\- Pas d'inhibition + Faible inhibition ou inhibition modérée
++ Forte inhibition (1) Résultats obtenus par Lelong et coll. (115).

L'évaluation des inhibitions par les fragments Fab dirigés contre les protéines de la sous-unité 30S a été effectuée à partir des courbes présentées dans les figures 26 et 27 et celles rapportées dans deux publications de notre laboratoire (115,151). Ces estima-

mêmes lots de sérum et que les ribosomes ont été préparés dans les mêmes conditions. Une première observation relative aux effets des Fab sur la traduction des RNA messagers naturels et du poly U nous indique que les taux d'inhibition par les anticorps dirigés contre les protéines S 1, S 4, S 5, S 9, S 10, S 11, S 13, S 15, S 16, S 18 et S 20 sont les mêmes dans les trois systèmes de synthèse protéique. Les anticorps anti-S 6, S 12, S 14, S 19 et S 21 sont plus efficaces dans les systèmes de traduction des messagers naturels que dans celui du messager synthétique. Par contre, l'inhibition des protéines S 2, S 3, S 8 et S 7 affecte préférentiellement la synthèse de polyphénylalanine à celle des protéines naturelles.

De l'ensemble de ces résultats nous proposons une classification des protéines en cinq groupes :

Groupe I : Ce sont les protéines qui participent au site A du ribosome. Les fragments dirigés contre ces protéines inhibent la traduction du poly U, des messagers naturels et la fixation du Phe-tRNA sur les 70 S. Par contre, ils sont sans effet direct sur la fixation du fMet tRNA.

Groupe II : Il rassemble les protéines qui ne sont pas affectées dans la fixation du Phe tRNA, EF Tu dépendante, mais le sont dans la fixation du fMet tRNA et la traduction du poly U et des RNA naturels : ce sont les protéines qui participent au site P du ribosome.

Groupe III : Il réunit les protéines qui sont neutralisées par l'action des Fab dans la traduction des mRNA naturels et du poly U et dans les fixations du fMet-tRNA et du Phe tRNA. Elles appartiennent à un site commun à l'activité du site A et du site P du ribosome.

Groupe IV : est relatif aux protéines qui participent principalement à la traduction des RNA messagers naturels et sont requises pour la fixation du fMet tRNA. Ce sont les protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse protéique. Selon qu'elles soient ou non associées à la fixation du Phe tRNA, elles sont regroupées respectivement dans le site commun ou dans le site P.

Groupe V : intéresse les protéines dont l'activité est liée à l'association du ribosome avec le mRNA. Elles se différencient des protéines classées dans le groupe relatif au site commun par le fait qu'elles participent activement à la réaction couplée transcription traduction. L'effet des anticorps dirigés contre les protéines de la sous-unité 30 S, sur le couplage transcription traduction de λ plac DNA, a été étudié par Michel Crépin dans notre laboratoire (151). Ces résultats nous ont permis de proposer un groupe particulier de protéines : le groupe VI.

Groupe VI : réunit les protéines qui participent au couplage transcription traduction et dont on a déterminé les effets sur la synthèse globale de mRNA et sur la formation de β galactosidase à partir du DNA de λ plac. Les protéines classées dans ce groupe se différencient de celles du groupe V par le fait qu'elles ne participent pas à la fixation du Phe tRNA ou du fMet tRNA. Nous avons distingué deux sous-groupes : l'un relatif aux protéines nécessaires à la traduction du mRNA naturel, l'autre regroupant les protéines qui sont sans effet sur les systèmes de traduction non couplés de ces RNA.

Selon ces définitions qui permettent de distinguer six groupes de protéines, nous proposons la répartition présentée dans le tableau VII :

Groupe I (site A) : S 8, S 9, S 11, S 18;

Groupe II (site P) : S 5 (S 6, S 12);

Groupe III (site commun) : S 2, S 3, S 10, S 13, S 20 (S 14, S 19, S 21);

Groupe IV (initiation) : S 6 et S 12 dans le site P et S 14, S 19, S 21 dans le site commun;

Groupe V (fixation du mRNA) : S 1;

Groupe VI (couplage transcription traduction) : S 7, S 15, S 16.

4. - COMPARAISON DES PROPOSITIONS RELATIVES A LA PARTICIPATION DES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S DANS L'ACTIVITE DU RIBOSOME

Si l'utilisation des fragments immuns monovalents Fab est particulièrement adaptée à la détermination des sites d'action des protéines ribosomiques, de par le haut degré de spécificité de leur interaction avec chaque protéine de la sous-unité 30 S, on peut néanmoins prévoir les limites de cette technologie. En effet, à l'exclusion de la protéine S 1, les protéines de la sous-unité 30 S ont un poids moléculaire compris entre 10.000 et 30.000, or celui des fragments Fab est d'environ 50.000. Leur interaction in situ avec une protéine de la sous-unité peut entraîner des modifications secondaires qui affectent la conformation de l'organite. Une telle interfé-

TABLEAU VII

PROPOSITION RELATIVE A LA FONCTION DES PROTEINES DE LA SOUS-UNITE 30 S

Groupe	Fonction	Protéines	Effets de la neutralisation				
			Traduction de Poly U	Traduction des mRNA naturels	Fixation du Phe tRNA	Fixation du fMet tRNA	Couplage avec la transcription
I	"A" site	S8-S9-S11-S18	+	+	+	-	+
II	"P" site	S5	+	+	-	+	+
III	Site commun	S2-S3-S10-S13-S20	+	+	+	+	(±)
IV	Initiation						
	(a) + "P" site	S6-S12	+	++	-	+	+
	(b) + site commun	S14-S19-S21	+	++	+	+	+
V	Fixation du mRNA	S1	+	+	+	+	++
VI	Couplage avec la transcription	S7	+	-	-	-	++
		S15-S16	+	+	-	-	+
VII	Site de décodage du triplet	S4 (S12)	+	+	-	-	-

rence peut donc limiter la portée de l'interprétation que nous formulons à partir de nos observations. Il est donc important de comparer nos résultats à ceux obtenus par l'utilisation de techniques différentes ou relatifs à l'étude de l'effet des anticorps sur des réactions particulières de la traduction comme l'hydrolyse du GTP dépendante de l'activité de facteurs solubles par exemple.

a) Protéines du groupe I (site A) : S 8, S 9, S 11, S 18.

D'autres travaux relatifs à des techniques de reconstitution ou d'addition de protéines fractionnaires ont montré que ces protéines étaient impliquées dans la fixation du Phe tRNA (135, 152, 153) : la localisation dans un même site des protéines S 18 et S 11 est en accord avec les observations selon lesquelles S 18 stabilise S 11 dans le processus d'assemblage (154) et le fait que les anticorps dirigés contre ces deux protéines empêchent la fixation de la streptomycine (115, 155). L'utilisation d'agent bifonctionnel a permis de montrer que S 18 et S 11 sont proches l'une de l'autre (156). On sait aussi que l'aminoacyl-t-RNA protège la protéine S 18 de la digestion par la trypsine (142). La technique de reconstitution de la sous-unité 30 S (154) et celle relative aux modifications chimiques de la protéine (157, 158) ont montré que la protéine S 18 était nécessaire à la traduction du poly U. Highland et coll. ont observé que S 18 participait au site de fixation du Phe tRNA (159) et, plus récemment, l'utilisation de marqueur d'affinité a permis de montrer que S 18 appartenait au site A des 70 S responsable du décodage des triplets (160, 161). Les anticorps dirigés contre S 9 et

S 11 inhibent l'hydrolyse du GTP, EFG dépendante (162). Ces deux protéines sont proches de l'interface (159,163). Les travaux relatifs à leur localisation corroborent ceux obtenus par iodination des résidus tyrosines des protéines, catalysée par la lactoperoxidase qui indiquent que S 11 et S 9 sont à la surface de la sous-unité 30 S (164, 165). On sait aussi que S 9 et S 11 interagissent avec l'aminoacyl-t-RNA, elles protègent le Phe tRNA de l'attaque par la ribonucléase (162). De plus, capables de s'associer avec le RNA 23 S (163,166), elles sont essentielles pour la fonction de L 7 et L 12, dans l'hydrolyse du GTP-EFG dépendante, dans la fixation du Phe tRNA EF Tu dépendante et dans l'association des sous-unités du ribosome (159,167). On sait, par ailleurs, que la modification de S 11 par le tétranitrométhane entraîne une perte de capacité de fixation du Phe tRNA par le ribosome (168). Enfin, S 11 intervient dans la fidélité de la traduction (135).

b) Protéine du groupe II (site P) : S 5.

On dispose de peu d'informations relatives à la fonction de S 5 si ce n'est que la reconstitution de sous-unité 30 S obtenue en absence de cette protéine inhibe la traduction de messagers naturels et de poly U sans affecter la fixation de poly U sur le ribosome (60,169). S 5 est nécessaire à l'association de la sous-unité 30 S avec la sous-unité 50 S (163) et se trouve à proximité de la protéine S 12 (170) que nous classons par ailleurs comme participant au site P dans l'initiation de la traduction.

c) Protéines du groupe III (site commun) : S 2, S 3, S 10, S 13, S 20.

L'utilisation de réactif bifonctionnel a montré que S 2 était proche de S 3 (171). La digestion par la trypsine indique que S 3, S 10, S 2 et S 13 sont situées à la surface de la sous-unité (114); de plus, ces protéines sont in situ très sensibles à la réaction à la glutaraldehyde (172).

La protéine S 20 a été décrite proche de l'interface (163). Elle protège le Phe tRNA de l'action de la ribonucléase (162) et son omission inhibe à 80 % la fixation de fMet tRNA (135).

Les protéines S 2 et S 3 ont été définies comme participant aux deux sites A et P par l'addition de protéines excédentaires (173). S 2 et S 3 ont été par ailleurs décrites comme impliquées dans la fixation de l'aminoacyl tRNA et du fMet tRNA (153).

La protéine S 10 protège l'attaque par la ribonucléase du Phe tRNA (162) et participe dans les expériences de reconstitution à la fixation de l'aminoacyl tRNA (115).

La technique d'utilisation de réactifs bifonctionnels a montré que S 13 est capable de s'associer à la fois à IF 2 et IF 3 (170). Le fait que cinq protéines participent à ce site commun, alors que 4 et 1 protéines sont classées respectivement dans le site A et P du ribosome, pose le problème de l'interaction de ces deux sites dans le fonctionnement normal du ribosome. En fait, des travaux avaient déjà montré que le fonctionnement de ces deux sites était très largement dépendant de l'occupation de chacun d'eux (174). Il est très légitime

de penser qu'au cours d'une traduction in vivo l'interaction peptidyl-tRNA-site P modifie la conformation du site A de telle manière que celui-ci soit reconnue avec une grande affinité par l'aminoacyl tRNA. Il est donc tout à fait raisonnable de trouver un nombre important de protéines dont l'interaction avec leur Fab spécifique induit les modifications de conformation du ribosome qui affectent à la fois les sites A et P du ribosome.

d) Protéines du groupe IV : initiation.

1 - Dans le site P : S 6 - S 12

La protéine S 6 est située à la surface de la sous-unité 30 S (165, 175). Dans un système de reconstitution, elle est nécessaire à la formation du complexe d'initiation (135, 176).

La protéine S 12 est nécessaire à la fixation du fMet tRNA dans les expériences de reconstitution (176). C'est une protéine de l'interface (163). Elle peut s'associer au RNA 23 S (163) et l'utilisation d'agents bifonctionnels a montré qu'elle était proche de IF 2 et de IF 3 (170). De nombreux travaux relatifs aux mutants streptomycine ont montré que la protéine S 12 était impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique (177). L'absence de S 12 dans les expériences de reconstitution inhibe spécifiquement la traduction de messagers naturels (176, 178).

2 - Dans le site commun : S 14, S 19, S 21.

La technique d'addition de protéines fractionnaires montre que S 14 agit de manière coopérative avec S 2 et S 3

dans la fixation du Phe tRNA sur le ribosome (153). (S 2 et S 3 sont classées parmi les protéines appartenant au site commun : groupe III). De même, il a été montré que S 19 était proche de S 13 que nous classons aussi dans le site commun (179, 171). Quant à la protéine S 21 elle est proche de S 18 (180, 181) et de S 11 (156), qui font partie du site A. De plus, l'utilisation de réactifs bifonctionnels a permis de montrer que la protéine S 14 était proche du site d'association de IF 2 et IF 3 sur le ribosome (170). Elle est considérée comme une protéine de l'interface (162). L'utilisation de la trypsine a montré qu'elle participe au site de fixation de la streptomycine (182). De plus, elle stimule la fixation du fMet tRNA (173) et elle est nécessaire à celle du Phe tRNA (136) qui la protège de l'action de la trypsine (142). Des expériences d'addition de protéines excédentaires ont permis de déterminer qu'elle participait à la fois au site A et au site P (173). Enfin, l'utilisation d'agent bifonctionnel montre que S 14 est proche de S 6 (183) que nous avons classée dans le même groupe mais située dans le site P.

Divers travaux indiquent que la protéine S 21 est à la surface de la sous-unité 30 S (165, 175). Cette protéine protège le Phe tRNA de l'attaque par la ribonucléase (162) et l'aminoacyl tRNA la protège de l'action de la trypsine (142). S 21 modifiée par le tétranitrométhane diminue la capacité de la sous-unité 30 S à fixer le Phe tRNA (168). Un excès de S 21 antagonise l'effet de IF 2 dans la fixation de fMet tRNA (173), mais les expériences de reconstitution montrent qu'elle est nécessaire à l'initiation de la traduction (135, 152). Le fragment Fab dirigé contre S 21 inhibe la fixation de la

streptomycine et de la spectinomycine (162). Enfin, S 21 et S 6 exercent une interaction mutuelle sur l'activité de IF 2 (135).

e) Protéine du groupe V : S 1

Les protéines ribosomiques des sous-unités 30 S et 50 S ont un poids moléculaire compris entre 9.600 (L 34) et 32.000 (L 2 et S 3), seule la protéine S 1 a un poids moléculaire élevé (65.000 - 68.000). Elle a donc une place particulière dans la classification des protéines ribosomiques et ne participe pas à l'assemblage de la sous-unité 30 S (184). Elle se situe au voisinage de la protéine S 12 (171) et participe au site d'association de la streptomycine et de la spectinomycine (162). Elle peut être associée à l'aide de réactifs bifonctionnels aux facteurs IF 2 et IF 3 (170). In situ, la protéine S 1 est accessible à de nombreuses réactions : action de la trypsine, du glutaraldehyde (175), elle est à la surface de la sous-unité 30 S. Bien que présente dans les polysomes (173), la protéine S 1 s'associe préférentiellement aux sous-unités natives (185). De nombreuses techniques ont montré que S 1 était impliquée dans la fixation de mRNA naturels ou synthétiques poly U (173, 186, 187). Mais récemment, il a été montré que la protéine S 1 était obligatoirement requise pour la formation du complexe d'initiation dirigé par un RNA messager naturel (RNA de MS 2), alors qu'elle n'est pas nécessaire à la fixation sur le ribosome du fMet tRNA dirigée par AUG ou du Phe tRNA poly U dépendante (188). De plus, le site d'association de S 1 sur la sous-unité 30 S est proche de l'extrémité 3'OH (185). Or, Shive et Dalgarno (189) ont

montré que cette extrémité a pour séquence Pyd - A - C - C - U - C - C - U - U - A_{OH} chez Escherichia coli, ce qui suggère une interaction avec les oligonucléotides appartenant au site d'initiation des mRNA (189, 190). Par ailleurs, on sait que S 1 est une sous-unité de la Q_β replicase (191, 192). S 1 est nécessaire spécifiquement à la replication du brin plus du phage, or ce brin a pour extrémité la séquence C - C - U - C - C - A_{OH} (193). L'ensemble de ces informations est favorable à l'hypothèse selon laquelle la protéine S 1 participe au couplage transcription - traduction.

f) Protéine du groupe VI.

1) La protéine S 7

On dispose de peu d'information relative à la fonction de cette protéine qui ne semble pas participer à un site de la sous-unité 30 S directement impliqué dans la traduction des messagers naturels. Cette protéine présente, ainsi que S 4, S 17, S 20, S13 et S 15 un site d'association sur le RNA 16 S (194). Il est à noter que c'est la protéine dont le site est le plus proche de l'extrémité 3'OH du RNA 16 S (195). Le fait que cette extrémité semble impliquée dans la reconnaissance de la séquence d'initiation des RNA naturels (189, 190) pourrait être en faveur de l'activité de cette protéine dans le couplage transcription-traduction. On sait, par ailleurs, qu'elle est située à la surface de la sous-unité 30 S (165).

2) Les protéines S 15 et S 16

L'utilisation d'agents bifonctionnels, le dimethylsuberimidate (DMS) a permis de montrer que les protéines S 15 et S 16 étaient proches l'une de l'autre (196). L'emploi de réactifs bifonctionnels différents a montré que S 16 s'associait avec les protéines de la sous-unité 50 S (170). Nos résultats sont cependant en contradiction avec les conclusions de Held et Nomura (154) selon lesquelles S 16 ne participerait à aucune fonction dans les ribosomes. Ils utilisent la technique de reconstitution de la sous-unité 30 S et montrent qu'en absence de la protéine S 16, le processus d'assemblage est ralenti, mais aucune fonction testée n'est altérée.

En fait, les travaux de ces auteurs montrent que les particules reconstituées en absence ou en présence de la protéine S 16 et les sous-unités 30 S normales, présentent la même activité dans la traduction du poly U ou la fixation du Phe tRNA. Par contre, les particules reconstituées en absence ou en présence de la protéine S 16 ont une activité plus faible (60 % environ) que celle de la sous-unité normale dans la traduction ou la formation du complexe d'initiation dirigée par un messager naturel. On ne peut donc conclure sans ambiguïté que le facteur limitant dans ces deux réactions soit le seul processus d'assemblage per se et que la protéine S 16 ne soit pas requise pour l'activité de la sous-unité 30 S normale dans la traduction des mRNA naturels. La seule divergence qui demeure est relative à la traduction du poly U.

g) Cas de la protéine S 4

La neutralisation par le Fab de cette protéine n'affecte ni la fixation du Phe tRNA sur le ribosome 70 S, ni celle du fMet tRNA sur la sous-unité 30 S, ni l'activité couplée transcription-traduction. Par contre, elle provoque une inhibition de la traduction des messagers naturels et du poly U.

Cette protéine présente un site d'association spécifique avec le RNA 16 S (195, 197). Elle est la plus proche de l'extrémité 5'P. Il a été récemment proposé qu'en plus de l'extrémité 3'OH, l'extrémité 5'P du RNA 16 S soit impliquée dans la fixation des séquences d'initiation des mRNA (198). De plus, l'utilisation d'agents bifonctionnels a montré que S 4 était voisine du site de fixation de IF 2 et IF 3 sur la sous-unité 30 S (170). On sait qu'elle est le produit du gène Ram (199) connu pour contrôler l'ambiguïté de la traduction (200). Ces résultats sont à rapprocher des travaux récents qui ont montré, par l'utilisation de la technique de marquage d'affinité (L'AUG bromoacetyle), que S 4 était impliquée dans un site de décodage des triplets aux côtés de S 18 (160). Le fait que S 18 soit dans le site A et que, par ailleurs, S 4 soit proche des protéines S 12 (201) et S 15 (196), toutes deux appartenant au site P, pourrait accréditer une hypothèse selon laquelle S 4 participerait au site de décodage des triplets, et serait située dans le site P, ou le site commun, du ribosome 70 S. Cependant, l'observation récente (161) selon laquelle la liaison covalente formée entre le codon AUG et les protéines S 18 et S 4 (liaison observée par la technique de marquage d'affinité) programme le ribosome pour la fixation

du tRNA initiateur, IF 2 dépendante, dans un site insensible à la puromycine, semble indiquer que S 4 ne peut être classée comme appartenant au site P. La position dans le site commun pourrait être retenue bien que sa fonction semble s'exercer essentiellement au niveau du site A (203). Le fait que le fragment Fab dirigé contre S 4 soit sans effet sur la fixation du Phe tRNA sur le ribosome pourrait signifier que ce contrôle réclame une conformation particulière de l'organite qui n'existe qu'après occupation du site P (174).

L'existence d'un site particulier à l'interaction tRNA ribosome dont la fonction serait de contrôler la fidélité des mécanismes de décodage de la traduction, a été proposé par Gorini (202). La base génétique de ces travaux relatifs au mécanisme de la suppression démontraient que deux protéines étaient impliquées dans ce site particulier : la protéine S 12 et S 4. Parce que la protéine S 4 est requise pour l'assemblage, Gorini proposait que seule S 12 soit directement impliquée dans ce système de contrôle. Notre proposition selon laquelle S 4 serait, en fait, directement responsable du fonctionnement du site de décodage pourrait être accréditée par le fait que contrairement à S 12, qui est une protéine fractionnaire, S 4 est classée en tant que protéine unitaire. L'importance d'un tel site dans la fidélité de la traduction nécessite vraisemblablement à chaque interaction ribosome-mRNA-tRNA l'expression de cette fonction; on sait, en effet, qu'<u>in vivo</u> les erreurs de lecture sont très rares.

Il a été montré par la technique de marquage d'affinité que S 12 peut former une liaison covalente avec le codon AUG dès lors que celui-ci permet la fixation du tRNA initiateur,

IF 2 dépendante, dans un site sensible à la puromycine (161). Tout se passe comme si la protéine S 12, qui est une protéine fractionnaire, effectuait un contrôle de la fidélité de l'initiation de la traduction en participant au niveau du site P à la reconnaissance codon-anti codon du tRNA initiateur. Par ailleurs, la protéine S 4, qui est une protéine unitaire, pourrait participer au contrôle, au niveau du site A, de la fidélité de reconnaissance codon-anti codon des tRNA qui sont impliqués dans l'élongation des chaines peptidiques. On pourrait donc formuler l'hypothèse que ces deux protéines S 4 et S 12 sont requises pour assurer le contrôle du positionnement correct sur le ribosome des aminoacyltRNA dans leur site d'association avec le mRNA.

CONCLUSION

Par l'utilisation des fragments immuns monovalents Fab nos résultats, relatifs à la participation des protéines de la sous-unité 30 S dans les différents mécanismes de la traduction, viennent préciser des observations effectuées dans d'autres laboratoires, à l'aide de techniques différentes. L'ensemble de ces études révèlent que ces protéines ribosomiques ne sont pas uniquement des molécules qui participent à la structure organisationnelle de la sous-unité ribosomique, mais sont aussi responsables de l'activité polyenzymatique de cet organite.

Notre proposition de classification des protéines en relation avec les différents sites actifs du ribosome pour être précisée, doit tenir compte de la participation des pro-

téines de la sous-unité 50 S ainsi que des interactions directes RNA-RNA. De nombreuses observations indiquent, en effet, que ces dernières interactions jouent un rôle capital dans le processus de la traduction, qu'il s'agisse de la fonction des extrémités du RNA 16 S dans l'initiation de la traduction (189, 190,198), de la participation du RNA 23 S dans la fixation des aminoacyl tRNA au niveau de leur extrémité CCA (204), de la relation vraisemblable entre les RNA 5 S et la séquence TΨCG commune à tous les tRNA (205) ou des interactions RNA 16 S - RNA 23 S dans la formation des 70 S (206).

On doit enfin s'interroger sur le fait que les anticorps dirigés contre les protéines fractionnaires, qui existent à moins de 0,6 copies par ribosome (6), inhibent la traduction. On doit remarquer que toutes les protéines que nous avons classées dans le groupe IV (initiation) sont fractionnaires. En plus de celles-ci, les seules protéines fractionnaires sont S 2 et S 10, le cas de S 1 faisant l'objet de contreverse (185).

De telles protéines pourraient être principalement requises, en dehors du processus d'assemblage, pour des fonctions qui n'intéressent, à tout moment dans les cellules, qu'une minorité de l'ensemble de la population des ribosomes. C'est ainsi que les protéines S 6, S 12, S 14, S 19 et S 21 s'associeraient principalement aux seules sous-unités qui, dans le cycle ribosomique, participent à la phase d'initiation de la traduction.

Plus généralement, si une telle hypothèse devait se vérifier, il conviendrait alors de reconsidérer la quantifica-

tion des protéines fractionnaires en la rapportant à la fraction de la population des ribosomes qui, à chaque instant dans la cellule, se trouve engagée dans un mécanisme précis de la traduction qui requiert l'activité de l'une ou l'autre de ces protéines ribosomiques appartenant à cette classe.

CHAPITRE III

REGULATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE AU NIVEAU DE LA TRADUCTION

La régulation de l'expression génétique définit les limites d'adaptation de la cellule à son environnement. Si la spécificité de structure des protéines détermine leur participation aux fonctions cellulaires, leur synthèse est le résultat d'un ensemble de mécanismes régulateurs responsables de l'adaptation des activités biologiques aux variations du milieu. On comprend alors que la connaissance de ces mécanismes se soit développée à partir de travaux relatifs à l'influence de l'environnement cellulaire sur l'expression d'une activité biologique particulière ou sur la synthèse globale de différents types de macromolécules informationnelles.

Régulation au niveau de la transcription

La structure et la répartition des unités de transcription sur le génome participent à cette régulation. L'existence de déterminants génétiques tels que les gènes régulateurs ou opérateurs proposés par Jacob et Monod (207), les éléments de ponctuation, promoteurs ou gènes de terminaison, et les gènes de modulation tel que l'"atténuateur" de l'opéron tryptophane (208), témoignent des lieux d'intervention des facteurs de régulation dans le processus de transcription. Aux côtés du répresseur, dont l'étude est liée à notre connaissance du contrôle homéostatique de l'induction enzymatique ou de la répression

des voies biosynthétiques (voir la revue de F. Gros (209)), d'autres facteurs de régulation tels que la protéine CAP qui participe au phénomène de repression catabolique (210,211) ou les facteurs de ponctuation σ (212) et ρ (213), ont permis de préciser la régulation de l'activité de la RNA polymérase.

Par ailleurs, ont été décrits plusieurs facteurs protéiques présentant une activité au niveau de la transcription, ce sont notamment, les protéines ω, D (214), Y (215), M (216), Ψ_r(217), H (218,219), I 1, I 2, I 3 (220), Hu (221) et TFms ("Transcription Factor""magic spot") (222). Cet ensemble de facteurs protéiques ainsi que les propriétés des unités de transcription ont justifié l'idée selon laquelle le contrôle de l'expression génétique chez les procaryotes, s'effectuait principalement au niveau de la synthèse des RNA. Cette idée s'est trouvée renforcée par le mode d'expression des programmes génétiques décrits chez les bactéries sporulantes ou au cours du développement des bactériophages (209,223).

Régulation au niveau de la traduction

La complexité des processus de traduction, le nombre élevé des éléments qui y participent peuvent laisser prévoir un contrôle de l'expression génétique au niveau des mécanismes impliqués dans la synthèse protéique. Nous avons, dans le chapitre précédent, relaté le problème de la fidélité de lecture des mRNA due aux propriétés du ribosome et à la structure du message qui, outre les codons traduits, possède des éléments de ponctuation. On connait aussi les mécanismes de suppression qui participent aux activités de décodage (224). Mais en dehors

des mécanismes dirigés par les lois du code génétique, le fait que les mRNA possèdent de longues séquences non traduites (225), a permis de proposer qu'une modulation de la traduction pouvait résulter d'une reconnaissance des structures secondaires de ces régions des messagers par les facteurs protéiques impliqués dans l'initiation de la synthèse des protéines (226-228) ou par le tRNA initiateur (229). Par ailleurs, le fait qu'au cours d'une infection par les bactériophages MS 2, Q_β ou R 17, leurs trois cistrons, présents dans la cellule à des concentrations identiques, soient traduits avec des efficacités différentes (230), plaide aussi en faveur de l'existence d'un mécanisme de contrôle au niveau de la traduction. De plus, l'observation selon laquelle après une infection par le bactériophage T4, les ribosomes perdent leur capacité de s'associer aux sites d'initiation des cistrons codant pour la protéine de l'enveloppe et la synthétase du phage R 17 (231) permettait de proposer que le processus d'initiation de la traduction intervenait dans ce contrôle.

Lee Huang et Ochoa (232) ont montré la présence de deux types de molécules IF 3 qui présentaient une activité différente selon le message traduit. Michel Revel et son groupe (233) ont proposé l'existence de plusieurs facteurs interférants dont la fonction proposée était de moduler la traduction de cistrons différents. En fait, il a été montré qu'au moins certains de ces facteurs interférants étaient des protéines de la sous-unité ribosomique 30 S (191,234,235) dont la concentration dans un système de traduction <u>in vitro</u> modifie l'efficacité de celle-ci (236). Par ailleurs, le facteur IF 3 traduit sans différence d'efficacité les mRNA "précoces" ou "tardifs" du bactériophage T4 (236).

La sélection des mRNA serait due à la sous-unité 30 S du ribosome (178,237) et non aux facteurs d'initiation (238). De plus, la structure secondaire du bactériophage R 17 permet l'interaction de la protéine de l'enveloppe du phage avec la région initiatrice du cistron de la synthétase, ce qui pourrait, en fait, participer à la régulation au niveau de la traduction (239). Quelles que soient les modalités de cette régulation, les résultats n'excluent pas un contrôle au niveau de la synthèse protéique; on sait, notamment, que la protéine S 1 de la sous-unité 30 S du ribosome est modifiée après infection par le phage T4 (233).

Couplage transcription-traduction

Au-delà des mécanismes de régulation propres à chacun des deux phénomènes, transcription et traduction pris isolément, la coordination de leur fonctionnement constitue un fait fondamental du contrôle de l'expression génétique chez les procaryotes. La notion de couplage de la transcription et de la traduction proposée par plusieurs auteurs (240-242) s'est trouvée accréditée par l'isolement de complexe DNA-RNA-ribosomes (243-245) dont la formation est dépendante de la présence de facteurs d'initiation de la synthèse protéique (243,245,246). Ceci permet de rendre compte du fait que l'initiation de la traduction s'effectue avant que la transcription du mRNA ne soit terminée (247). Un tel complexe a été photographié au microscope électronique (248). De plus, la transcription *in vitro* de l'opéron lactose est stimulée par la formation du complexe d'initiation de la traduction (249) et un mutant thermosensible pour la pro-

téine S 12 de la sous-unité ribosomique 30 S inhibe à la température non permissive la transcription de l'opéron tryptophane (250). Il a été observé une association directe du ribosome sur un brin du DNA de T4 contenant les gènes des RNA messagers précoces du bactériophage (251,252) et, récemment, a été montré l'existence d'un site spécifique d'association d'un brin du DNA du bactériophage ø X 174 avec un ribosome inclus dans un complexe d'initiation de la traduction (253).

Par ailleurs, des données relatives au mode de synthèse et de traduction du mRNA plaident en faveur d'un couplage de la transcription et de la synthèse protéique. En effet, la formation, la traduction et la dégradation des mRNA se font à partir de leur extrémité 5' en direction de leur extrémité 3' (254,257). Une ribonucléase responsable de cette dégradation a été localisée sur les polysomes (258). De plus, on sait que le taux d'élongation des chaînes protéiques est de 20 acides aminés/seconde/ribosome actif (259), alors que celui des séquences de RNA est estimé selon les auteurs de 43 à 55 nucléotides/seconde (260,261 respectivement). Ces valeurs sont indépendantes du taux de la croissance bactérienne (μ) au moins pour des valeurs de μ supérieures à 1 (259-261).

Au cours de ces dernières années de nombreux travaux ont montré que des facteurs impliqués dans la traduction présentaient des activités au niveau de la transcription. On sait, par exemple, que la Q_β replicase contient trois sous-unités de la cellule hôte, les facteurs EF Tu, EF Ts et la protéine S 1 (262). On a décrit, par ailleurs, un facteur I présentant des analogies avec la protéine S 1, qui est induit par l'infection du bactériophage T7 chez des souches F^- de E. coli. Cette pro-

téine inhibe la traduction des mRNA de MS 2 et l'activité de la RNA polymérase de la cellule hôte (263). De plus, le ppGpp, constituant essentiellement formé au niveau du ribosome en présence de mRNA et de tRNA non acylé (264), a été décrit comme ayant un effet inhibiteur sur la transcription des RNA ribosomiques par une action directe avec la RNA polymérase (265) ou par l'intermédiaire d'une association avec le facteur EF Tu (217,266). Le facteur EF Tu forme avec EF Ts le complexe Ψ_r qui a été décrit comme participant à la synthèse des RNA ribosomiques (217). Le ppGpp stimule la synthèse in vitro du messager de l'opéron lac (267), il s'associe avec le facteur TF ms pour accroître la transcription des opérons Lac et Gal (222). De plus, il est proposé que le nucléoside tétraphosphate module l'activité d'une protéine qui reconnaitrait spécifiquement l'atténuateur de l'opéron tryptophane (208,268).

Une mutation dans le facteur EFG affecte la synthèse des RNA stables (269-271). L'AMP cyclique dont on connait l'activité dans la répression catabolique (210,211) inhibe l'activité de la ribonucléase V, responsable de la dégradation des mRNA, en s'associant avec le facteur EFG qui est nécessaire à l'activité nucléolytique (272).

Enfin, il semble que les gènes codant pour les sous-unités de la RNA polymérase soient proches des unités de transcription des protéines ribosomales (273-276) et du facteur EF Tu (276).

Par ailleurs, une observation relative à la synthèse globale des macromolécules informationnelles a permis de rendre compte d'un couplage de la transcription et de la traduction.

La carence en acide aminé entraîne chez une souche sauvage de Escherichia coli une diminution immédiate du taux de synthèse des RNA corrélative à une inhibition d'environ 95 % du taux de synthèse protéique. Les bactéries mutées dans le gène Rel A (Rel A^-) ou les cellules Rel A^+ traitées par certains antibiotiques sont capables de synthétiser leurs RNA en absence de traduction active. De plus, l'expression du gène Rel A à l'état dominant (Rel A^+) induit la formation, au cours de la carence en acide aminé, du ppGpp et du pppGpp (appelés MSI et MSII respectivement). La synthèse du nucléoside pentophosphate est dirigée par le produit du gène Spo T (277). Plusieurs monographies récentes rendent compte des différentes fonctions cellulaires qui sont affectées par l'expression du gène Rel A^+ (278-280).

Croissance cellulaire et biosynthèse des macromolécules informationnelles

Si les observations que nous venons de rappeler plaident en faveur de l'existence de mécanismes de régulation qui assurent une coordination de l'activité de la traduction et de la transcription, un tel modèle ne peut cependant, à lui seul, rendre compte du contrôle de l'expression génétique chez les procaryotes. On sait, en effet, qu'à des modifications du taux de croissance cellulaire (μ) chez des bactéries maintenues en phase exponentielle, correspondent des variations dans la composition relative des différents types de macromolécules informationnelles (15). Si le rapport protéines solubles/DNA est indépendant de μ, les rapports RNA ribosomiques/DNA et protéines ribosomales/DNA s'accroient avec le taux de croissance cellulaire (15,89,281,282). Tout se passe comme si les ribosomes

étaient soumis à un système de régulation qui coordonne la synthèse de leurs constituants, différent de celui responsable du taux de formation des protéines solubles. On sait que la synthèse du rRNA et des protéines ribosomiques est soumise au contrôle du gène Rel A^+ (283-285) et qu'au cours d'une augmentation du taux de croissance d'une culture bactérienne (expérience communément appelée "Shift Up") rRNA et protéines ribosomiques sont synthétisés à un taux supérieur à celui caractéristique des conditions nouvelles du milieu 15 minutes environ avant que ne soient modifiés les taux de formation des mRNA, du DNA et des protéines solubles (89,286). Toutes les protéines ribosomales subissent cette variation avec la même efficacité sauf la protéine S 1 (286). Par ailleurs, il a été montré qu'à l'exception des protéines S 6, S 21 et L 12, il n'y avait pas de modification dans la composition relative des différentes protéines ribosomales en fonction du taux de croissance cellulaire (6), pas plus qu'il n'y a de variation dans la quantité relative des trois types de RNA ribosomiques. Ainsi on observe à tous les taux de croissance un pool très faible de protéines ribosomiques libres ou de précurseurs des rRNA (89) bien que le premier s'accroisse avec μ (287).

Le fait que le rapport ribosome/DNA augmente alors que celui protéines solubles/DNA reste constant en fonction de μ, conduit à penser qu'il existe un système de régulation dont la fonction serait de moduler la quantité de ribosomes actifs dans la cellule aux différents taux de croissance. Les observations qui ont permis de montrer que la quantité de molécules de RNA polymérase est en excès par rapport aux activités de la transcription <u>in vivo</u> (288) et que les vitesses d'élonga-

tion des chaînes de RNA et de protéines sont indépendantes de μ (au moins pour les valeurs de $\mu > 1$) (259,261) laissent prévoir l'existence d'un mécanisme de régulation de l'efficacité de la traduction qui détermine le nombre des chaînes protéiques en croissance. On sait que la quantité de tRNA dans la cellule n'est pas limitante au moins pour des taux de croissance bactérienne supérieurs à 0.5 (282,289). De plus, les facteurs d'élongation EF Tu, ET Ts et EF G sont présents dans la cellule avec un rapport d'une molécule de chaque facteur par ribosome quelle que soit la valeur de μ (290). Le fait que la proportion de ribosomes actifs engagés dans la synthèse protéique soit indépendante de μ (259,291,292) et corresponde à 77 % de l'ensemble de la population ribosomique (259), laisse prévoir qu'il existe un mécanisme de régulation responsable du fonctionnement du cycle ribosomique. Les facteurs d'initiation de la traduction, qui existent en quantité limitante dans la cellule par rapport au nombre de ribosome (293), pourraient participer à un tel mécanisme de régulation. Une façon d'approcher ce phénomène est d'étudier les relations éventuelles entre la stabilité relative de ces facteurs et leur possibilité d'association avec la sous-unité 30 S. Cette étude fait l'objet des travaux que nous rapportons dans la première partie de ce chapitre.

Dans la seconde partie, nous avons déterminé l'influence du ppGpp sur l'activité des différentes étapes de la traduction, dans des conditions de concentrations du nucléoside tétraphosphate analogues à celles présentes dans les cellules Rel A^+ carencées en acide aminé.

A. - INFLUENCE DU MODE D'INHIBITION DE LA TRADUCTION, SUR L'ACTIVITE DES FACTEURS D'INITIATION DE LA SYNTHESE PROTEIQUE

Au moment où nous avons commencé cette étude, Young et Nakada (294,295) avaient montré que l'arrêt de la traduction provoquée par l'addition de chloramphénicol à une culture en croissance exponentielle, entraînait une baisse de la capacité des ribosomes à traduire *in vitro* les mRNA naturels. Cette inhibition était attribuée à une réduction de l'activité du facteur IF 3 et à un moindre degré du facteur IF 2. Les auteurs proposaient par ailleurs, que cette inactivation devait être correlée avec l'existence d'une phase de latence qui précède la restauration d'un taux normal de la synthèse protéique après l'élimination de l'antibiotique. Une telle période transitoire étant observée chez des bactéries Rel A^- carencées en acide aminé, au cours de la restauration de celui-ci dans le milieu de culture, nous nous sommes proposé d'étudier l'évolution des facteurs d'initiation de souches de *Escherichia coli* Rel A^+ et Rel A^- carencées en acides aminés.

De plus, si on émet l'hypothèse que l'instabilité des facteurs d'initiation est liée au fonctionnement du cycle ribosomique, la modification de leur activité pouvait être un phénomène dépendant du mode d'inhibition de la traduction. On sait, en effet, que si le chloramphénicol inhibe l'échange entre les sous-unités ribosomiques et les complexes mRNA-ribosomes (1), la puromycine, au contraire, a tendance à le stimuler (296). Nous avons donc comparé le devenir des facteurs d'initia-

tion de la traduction chez des bactéries traitées par le chloramphénicol et par la puromycine.

1 - Capacité des extraits de cellules carencées en acide aminé ou traitées par les antibiotiques à traduire les mRNA naturels.

Des extraits bruts dialysés (S 30) de cellules traitées par le chloramphénicol et la puromycine présentent une capacité réduite à traduire les mRNA tardifs du bactériophage T4. Cette inhibition est d'environ 75 % comparée à l'activité des extraits de cellules non traitées. Une telle réduction ne se produit pas chez des bactéries Rel A^+ et Rel A^- carencées en arginine (tableau VIII). Afin de localiser l'origine des inhibitions observées, nous avons testé l'activité des ribosomes isolés des surnageants S 100 qui renferment, notamment, les facteurs d'élongation de la traduction. Comme l'indique le tableau IX, seuls les ribosomes des bactéries traitées au chloramphénicol présentent une réduction dans leur capacité à assurer la traduction du mRNA de T4. Cette perte de capacité est indépendante de la souche bactérienne utilisée. Par contre, les ribosomes de cellules traitées par la puromycine pendant 120 minutes, ainsi que ceux des bactéries carencées en arginine, présentent une activité dans la traduction semblable à celle des ribosomes de cellules en croissance exponentielle.

Si nos résultats sont comparables à ceux publiés par Young et Nakada (294,295), il apparait cependant que la perte de capacité des ribosomes à traduire *in vitro* les mRNA naturels ne provient pas d'un simple arrêt de la synthèse protéique *in vivo* comme le prétendaient ces auteurs. Le mode d'inhibition

TABLEAU VIII

ACTIVITE DANS LA SYNTHESE PROTEIQUE DES EXTRAITS DE BACTERIES CARENCEES EN ARGININE OU TRAITEES PAR UN ANTIBIOTIQUE

Origine du S 30	pmoles de valine incorporée par $A_{260\ nm}$ unité	% activité
Exp. 1 (souche PA2)		
Cellules non traitées	22.0	100
Cellules + chloramphénicol	5.1	23
Exp. 2 (souche PA1)		
Cellules non carencées	12.7	100
Cellules carencées en arginine	10.8	85
Exp. 3 (souche PA2)		
Cellules non carencées	26.0	100
Cellules carencées en arginine	19.0	72
Exp. 4 (souche AS19)		
Cellules non traitées	23.0	100
Cellules traitées à la puromycine	5.5	24

Les souches d'Escherichia coli PA1 (Arg^-, B_1^-, Rel A^-) et PA2 (Arg^-, B_1^-, Rel A^+) ont été décrites dans le premier chapitre. MRE 600 est un mutant RNAase I^- isolé par Cammack et Wade (364). AS 19 est une souche perméable à l'actinomycine D décrite par Sekigucki et Iiva (365), elle est sensible à de faibles concentrations de puromycine (5 à 10 µg/ml).

Les cellules ont été cultivées sur le milieu M9 (Na_2HPO_4, 7 g; KH_2PO_4, 3 g; NaCl, 0.5 g; NH_4Cl, 1 g; $Mg(SO_4)^2$, 0.12 g; $CaCl_2$, 0.011 g; pour un litre) supplémenté avec 0.4 % de glucose, puis casaminoacides (Difco). Dans les expériences de carence en arginine, les casaminoacides ont été remplacés par un mélange d'acides aminés synthétique moins l'arginine. La carence a été réalisée en utilisant des concentrations limitantes en arginine : 25 µg/ml. La croissance a été effectuée à 37° C. Le temps de génération est d'environ 35 minutes. Le chloramphénicol a été utilisé à une concentration finale de 100 µg/ml et la puromycine à 10 µg/ml. Les cellules ont été exposées au chloramphénicol ou carencées en arginine pendant 180 minutes. Dans le cas du traitement par la puromycine, le temps d'exposition à l'antibiotique a été réduit à 120 minutes.

Les bactéries ont été récoltées par centrifugation et lavées dans le tampon I (Tris 10mM, pH 7.5; Acétate de Magnésium, 5mM; NaCl 10mM) à 4° C. Le culot bactérien a été soniqué après resuspension dans le tampon II (Tris 10mM, pH 7.5; NH_4Cl, 60mM; Acétate de Magnésium 10mM; β-mercaptoéthanol, 7mM). Les extraits ont été centrifugés 10 min. à 10.000 rpm, puis 20 min. à 30.000 g (rotor Spinco 50 Ti) afin d'éliminer les bactéries non ouvertes et les débris cellulaires. Le surnageant ainsi obtenu (S 30) a été dialysé 4 heures contre le tampon II, puis conservé à l'azote liquide.

Les conditions de traduction utilisées sont celles décrites par Salser et Coll.(359). Le système comprend les produits suivants : Tris HCl, pH 7.8, 60mM; NH_4Cl, 60mM; Acétate de Mg, 8mM; réactif de Cleland (DTT), 2.2mM; ATP, 1.5mM; GTP, 0.1mM; PEP, 6mM; pyruvate kinase, 10 µg; un mélange de tous les acides aminés moins la valine (chacun à la concentration de 0.12mM; ^{14}C valine (22 µCi/µm) 0.02mM; RNA messager tardif de T4 : 100 µg. L'incubation a été effectuée à 37° C pendant 30 min. dans un volume total de 0.1 ml. La synthèse protéique a été mesurée en déterminant la radioactivité incorporée dans la fraction TCA insoluble à chaud. Le mRNA tardif de T4 a été obtenu après extraction du RNA total prélevé après 25 minutes d'infection. L'infection a été réalisée selon les conditions décrites par Gesteland et Coll. (357).

TABLEAU IX

ACTIVITE DANS LA TRADUCTION DES RIBOSOMES DE CELLULES CARENCEES EN ARGININE OU TRAITEES PAR UN ANTIBIOTIQUE

Expériences	pmoles de valine incorporée par A260 nm de ribosomes	% activité
Exp. 1 (souche MRE 600)		
70 S (contrôle)	50.0	100
70 S (cellules + CAM)	10.9	21
Exp. 2 (souche PA2)		
70 S (contrôle)	59.5	100
70 S (cellules + CAM)	18.6	31
Exp. 3 (souche PA1)		
70 S (contrôle)	41.0	100
70 S (cellules carencées en arginine)	40.0	98
Exp. 4 (souche PA2)		
70 S (contrôle)	64.0	100
70 S (cellules carencées en arginine)	68.0	107
Exp. 5 (souche AS19)		
70 S (contrôle)	40.8	100
70 S (cellules traitées à la puromycine	38.4	94

Les ribosomes ont été obtenus après une centrifugation de 5 heures (150.000 g) des "S 30". Le culot a été lavé deux fois par le tampon II et centrifugé dans les mêmes conditions. Les ribosomes ont été resuspendus dans le tampon II.

La traduction est dirigée par le mRNA tardif de T4. Le milieu réactionnel contient, dans un volume total de 100 µl, 200 µg de surnageant S 150 et des ribosomes en quantité limitante. Le surnageant S150 a été préparé par centrifugation du S 30 pendant 3 heures à 150.000 g, seule la moitié supérieure du surnageant a été prélevée, puis dialysée contre le tampon II pendant 4 heures.

Les conditions de culture des cellules ainsi que celles relatives à la composition du milieu réactionnel sont décrites dans le tableau VIII.

de cette synthèse a donc une influence déterminante sur la stabilité de l'activité des ribosomes.

Le tableau X et la figure 30 montrent que les surnageants S 150 de cellules traitées au chloramphénicol et carencées en acides aminés ne sont pas affectés dans leurs activités dans la synthèse protéique. Par contre, les surnageants de cellules traitées à la puromycine présentent une inhibition importante (figure 31). Nous n'avons pas recherché à déterminer l'origine de cette inhibition; on peut cependant proposer qu'elle résulte de la présence de la drogue sous une forme non dialysable, éventuellement, sur des peptidyl-puromycine, l'antibiotique pouvant être recyclé au cours de l'incubation dans les systèmes de traduction in vitro.

2 - Origine de l'inhibition des ribosomes de cellules traitées par le chloramphénicol.

L'inhibition dans l'activité traductrice des ribosomes que nous venons de décrire a été mesurée à partir de préparations ribosomiques qui n'avaient pas été soumises à des traitements susceptibles d'en extraire les facteurs d'initiation. On pouvait donc penser que dans ces conditions d'extraction, l'antibiotique était susceptible de contaminer ces préparations. Young et Nakada (295) avaient toutefois éliminé cette hypothèse puisqu'ils observaient que le taux d'inhibition des ribosomes évoluait en fonction du temps d'incubation des cellules mises en présence d'une concentration fixe de chloramphénicol. La figure 32 montre en effet, que dans nos conditions ce n'est qu'après 60 minutes de traitement des cellules par la drogue que l'on observe une inhibition maximale. Par ailleurs, des lavages répétés des ribo-

TABLEAU X

ACTIVITE DANS LA SYNTHESE PROTEIQUE DES SURNAGEANTS S 150 DE CELLULES TRAITEES PAR LE CHLORAMPHENICOL ET LA PUROMYCINE

Expériences	mRNA utilisé	pmoles d'acide aminé incorporé par A260 nm de ribosome	% activité
Exp. 1	T4		
S 150 (50 µg)		64.0	100
S 150 CAM (50 µg)		71.5	110
Exp. 2	T4		
S 150 (50 µg)		33.0	100
S 150 puro (50 µg)		13.0	39
Exp. 3	T4		
S 150		43.0	100
S 150 puro		21.2	50
Exp. 4	Poly U		
S 150		289.0	100
S 150 CAM		311.0	107

La traduction du poly U a été réalisée dans un milieu réactionnel contenant : Tris HCl, pH 7.5, 35 mM; NH_4Cl, 100 mM; ATP, 2 mM; PEP, 5 mM; GTP, 0.4 mM; Mg acétate, 20 mM; β-mercaptoethanol, 1 mM; tRNA déchargé de E. coli 25 µg; pyruvate kinase, 2 µg; ^{14}C phénylalanine, 0.1 mM (25 µCi/µmole); poly U, 100 µg. Ribosomes préparés dans les conditions décrites tableau IX : 1 A260 unité. L'incubation a été réalisée pendant 20 minutes à 37° C dans un volume total de 60 µl. La radioactivité TCA précipitable à chaud a été mesurée.

Pour la synthèse protéique dirigée par le RNA tardif du T4, 100 µl le milieu réactionnel contenait 0.7 A260 unités de ribosomes.

Les surnageants S 150 ont été préparés selon la technique décrite tableau IX.

Dans les expériences 1 et 2, le S 150 a été utilisé en quantité limitante. Dans les expériences 3 et 4, le S 150 a été utilisé en quantité saturante au regard de la concentration en ribosomes. S 150, S 150 CAM et S 150 puro se réfèrent respectivement à la fraction du surnageant extrait de cellules en phase exponentielle, ou traitées par le chloramphénicol ou la puromycine (voir tableau VIII).

Dans les expériences 1, 2 et 3, ^{14}C val a été utilisée comme marqueur alors que dans l'expérience 4, l'incorporation de ^{14}C Phe a été déterminée.

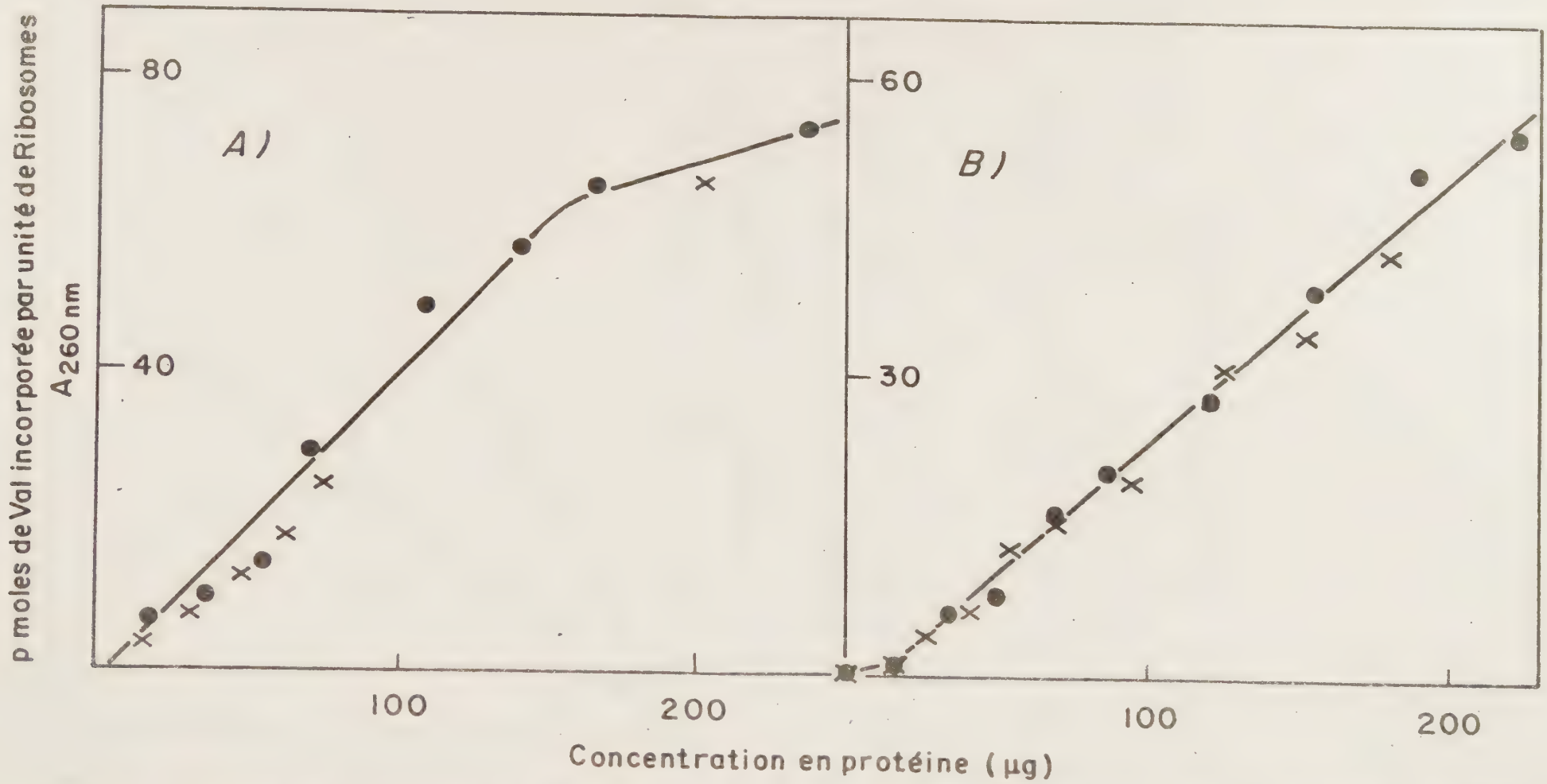


Figure 30 : ACTIVITE DES SURNAGEANTS S 150 DES CELLULES PA1 ET PA2 CARENCEES EN ARGININE, DANS LA TRADUCTION DES mRNA TARDIFS DE T4

La préparation des surnageants S 150 de cellules PA1 et PA2 carencées en arginine pendant 180 min., ainsi que la mesure de leur activité dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4 ont été réalisées selon les conditions décrites dans le tableau X.

La concentration en protéine a été déterminée selon la méthode de Lowry et coll. (360).

Le graphique A indique l'activité des surnageants S 150 des cellules de la souche PA1 carencées 180 min. en arginine (X——X) ou maintenues en phase exponentielle de croissance (●——●).

Le graphique B indique l'activité des surnageants S 150 de cellules de la souche PA2 carencées 180 min. en argi

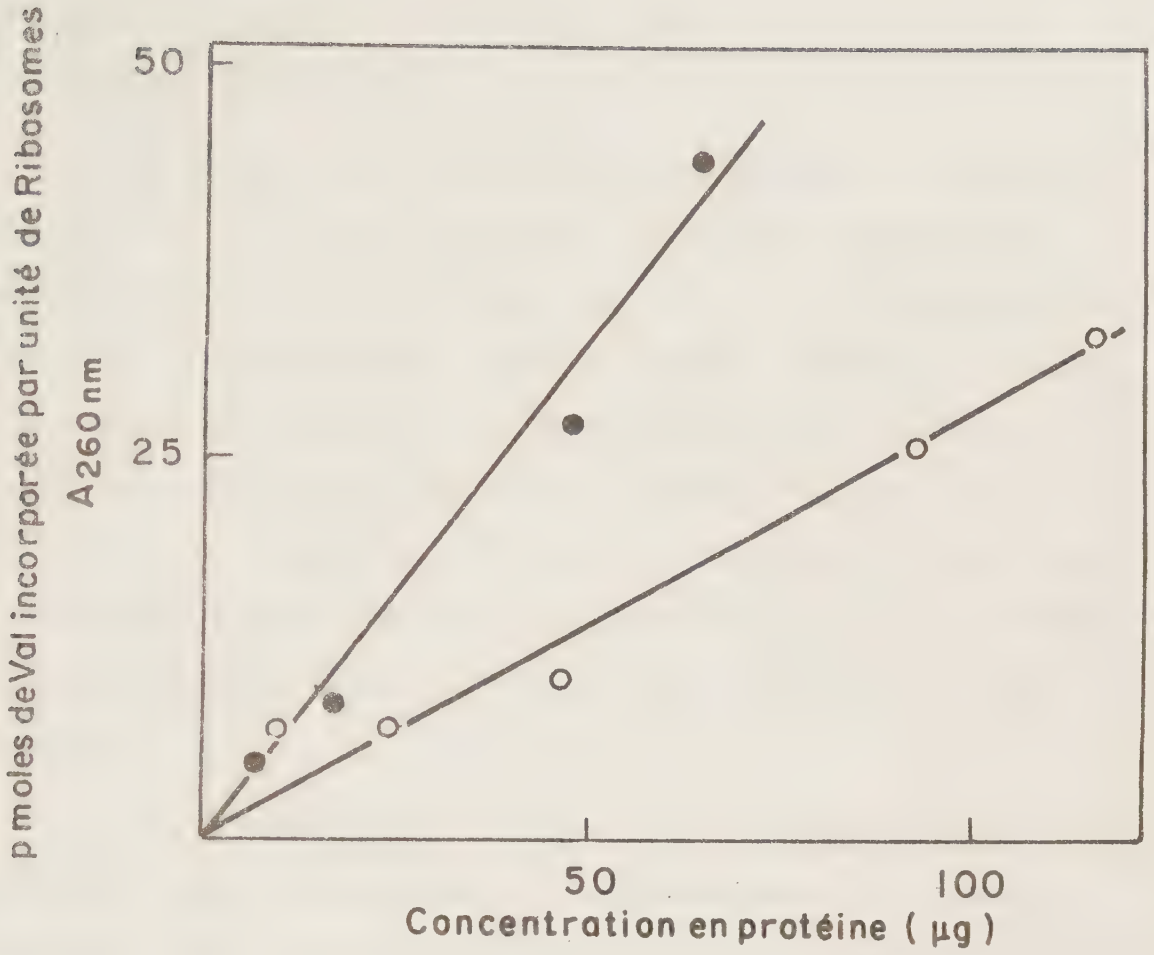


Figure 31 : ACTIVITE DES SURNAGEANTS S 150 DES CELLULES AS 19 TRAITEES PAR LA PUROMYCINE DANS LA TRADUCTION DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4

La préparation et la mesure de l'activité des surnageants sont identiques à celles décrites dans la figure 31 et le tableau X.

●——● activité des surnageants S 150 de cellules de la souche AS 19 récoltées en phase exponentielle.

X——X activité des surnageants S 150 de cellules de la souche AS 19 traitées par la puromycine pendant 120 minutes.

somes dans le tampon d'extraction (tampon II)(tableau XI) ne permettent pas de restaurer l'activité.

On peut aussi penser que des particules chloramphénicol 18 S et 25 S soient présentes dans nos préparations ribosomiques, ce qui nous aurait conduit à une détermination erronée de la radioactivité spécifique des ribosomes. Selon cette hypothèse, notre mesure de l'absorption à 260 nm des préparations ribosomiques obtenues à partir de cellules traitées par le chloramphénicol, serait en fait celle d'un mélange de particules ribonucléoprotéiques inactives et de ribosomes, ce qui nous aurait amené à sous-estimer l'activité des seuls ribosomes.

Une telle hypothèse peut être rejetée, Dagley et Sykes (297) ayant montré que le traitement aux ultra-sons - technique que nous avons utilisée au cours de l'extraction cellulaire - détruit ces particules. De plus, nous avons vérifié, par analyse sur gradient de saccharose, que les préparations ribosomiques mises en oeuvre en étaient dépourvues.

On pouvait aussi attribuer cette inactivation à une modification de la structure du ribosome. Le traitement par un tampon contenant du chlorure d'ammonium molaire ou "tampon III" (tableau XI) entraîne l'élimination, notamment, des facteurs d'initiation et des peptidyl-tRNA présents sur le ribosome. Un tel traitement permet de restaurer une activité normale dans la traduction de poly U ou des mRNA tardifs du bactériophage T4. Dans ce dernier test, nous avons comparé l'activité de ribosomes extraits de cellules incubées en présence de chloramphénicol à celle des ribosomes provenant de bactéries récoltées au cours

TABLEAU XI

TRADUCTION DE POLY U ET DES MESSAGERS TARDIFS DU PHAGE T4 PAR DES RIBOSOMES DE CELLULES TRAITEES AU CHLORAMPHENICOL ET A LA PUROMYCINE

Traitement	Ribosomes		% activité par rapport au contrôle
Exp. 1			
E. coli PA2 traité par le chloramphénicol	70 S	T4 mRNA	31.8
	70 S lavés par le tampon II		32.9
	70 S lavés par le tampon III		99.5
Exp. 2			
E. coli PA2 traité par le chloramphénicol	70 S	Poly U	30.4
	70 S lavés par le tampon III		84.0
Exp. 3			
E. coli AS19 traité à la puromycine	70 S	T4 mRNA	92.0
	70 S lavés par le tampon III		96.0

Les ribosomes obtenus après centrifugation dans le tampon II (voir tableau IX) ont été resuspendus dans le tampon III (Tris, 10 mM, pH 7.5; NH_4Cl, 1 M; Acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol, 7 mM) et agités lentement à 4° C pendant une nuit. Ces ribosomes ont été ensuite centrifugés 5 heures à 150.000 g, le culot a été repris dans du tampon II et conservé à l'azote liquide : ils constituent les ribosomes lavés au NH_4Cl 1 M, appelés ribosomes lavés au tampon III.

Pour obtenir la préparation brute de facteur d'initiation le surnageant produit de la centrifugation des ribosomes agités dans le tampon III, a été précipité avec 75 % de $(NH_4)_2 SO_4$. Ce précipité a été dissous et dialysé toute la nuit contre le tampon IV (Tris, 10 mM, pH 7.5; β-mercaptoethanol, 7 mM). L'ensemble de ces manipulations a été réalisé à 4° C.

Les facteurs d'initiation ont été ajoutés afin d'obtenir l'activité maximum de la traduction en mRNA tardif de T4.

Les valeurs de référence dans les expériences 1, 2 et 3 correspondent (en picomoles par unités A260 nm de ribosome) respectivement à 69.0 (^{14}C valine), 340 (^{14}C phénylalanine) et 134 (^{14}C valine). Les milieux réactionnels de la traduction du mRNA tardif de T4 ou du poly U ont été décrits dans les légendes des tableaux précédents (tableaux VIII et X).

de la phase exponentielle de croissance. La détermination de l'activité de ces préparations ribosomiques qui ont été traitées par le tampon III et sont ainsi dépourvues de facteurs d'initiation endogènes, a été effectuée en présence de quantité saturante d'un même extrait brut de facteurs d'initiation isolé à partir de cellules en croissance exponentielle. Le fait que nous restaurions dans ces conditions l'activité des ribosomes obtenus à partir des bactéries incubées en présence de chloramphénicol, indique que la structure du ribosome per se n'est pas responsable de la perte de la capacité à traduire les mRNA naturels que présentaient les extraits S 30 des bactéries traitées par l'antibiotique.

On sait que le chloramphénicol accroit l'efficacité d'association des peptidyl-tRNA sur le ribosome (298,299). Le fait que l'on puisse restaurer l'activité de la traduction du poly U après traitement des ribosomes par le tampon III, plaide en faveur de la participation au moins partielle de l'encombrement des peptidyl-tRNA sur le ribosome dans leur perte de capacité fonctionnelle au cours de la traduction in vitro (tableau XI). Toutefois, le fait le plus important réside en une baisse de l'activité de l'initiation de la synthèse protéique dirigée par les messagers naturels. On sait que l'efficacité d'une population de ribosomes à traduire les mRNA naturels peut être accrue par l'addition de facteurs d'initiation exogènes. Le tableau XII montre que le taux de stimulation de l'activité des ribosomes extraits de cellules traitées par le chloramphénicol est plus élevé que celui des ribosomes provenant de bactéries non traitées. De plus, cet accroissement de l'activité par l'addition de facteurs exogènes est plus important pour les

TABLEAU XII

EFFETS DE LA STIMULATION PAR LES FACTEURS D'INITIATION EXOGENES DES RIBOSOMES DE BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE ET TRAITEES PAR LE CHLORAMPHENICOL

Origine des ribosomes	pmoles de valine incorporée par A260 nm unités de ribosomes		Efficacité relative dans la traduction		Stimulation
	O IF	+ IF	O IF	+ IF	
Cellules en croissance exponentielle	97.0	155.0	100	160.0	1.6
Cellules traitées 30 min. par le CAM	54.0	103.0	55.0	106.0	2.0
Cellules traitées 180 min. par le CAM	30.8	116.0	31.4	118.0	3.8

Le mRNA tardif de T4 a été utilisé comme messager. Les facteurs d'initiation ont été obtenus de cellules en croissance exponentielle. 100 % d'activité est défini comme étant le taux de synthèse protéique formé par des ribosomes de cellules non traitées et sans addition de préparation brute de facteurs d'initiation exogène.

ribosomes de cellules incubées pendant 180 minutes en présence de l'antibiotique que pour ceux extraits de bactéries prélevées après 30 minutes de traitement par la drogue. Or, sans addition de facteurs d'initiation exogènes, les activités résiduelles de ces deux préparations de ribosomes sont respectivement de 50 % et de 20 % environ (figure 32).

Ces résultats semblent indiquer que la perte progressive de la capacité des ribosomes à traduire les mRNA in vitro, survenant après incubation des cellules en présence de chloramphénicol, est due à une modification de l'activité des facteurs d'initiation de la synthèse protéique.

De plus, l'addition de la sous-fraction AS 2, qui contient les facteurs IF 1 et IF 3, ou du facteur purifié IF 3, stimule avec une efficacité analogue à celle des extraits bruts de facteurs d'initiation, les ribosomes provenant des cellules traitées par l'antibiotique; la fraction AS 1, qui contient le facteur IF 2, et les facteurs IF 1 et IF 2 purifiés, ne restaurent pas la capacité de traduction de ces ribosomes (tableau XIII).

Nos résultats sont donc en accord avec ceux de Young et Nakada (295) qui attribuaient à une perte d'activité du facteur IF 3 la baisse d'efficacité des ribosomes de cellules traitées par le chloramphénicol à traduire les mRNA naturels.

Nous avons pu vérifier, par ailleurs, que "l'activité associée au facteur IF 3" n'était pas présente dans le surnageant S 150 des bactéries traitées par la drogue, comme le laissaient d'ailleurs prévoir les résultats rapportés dans le tableau X. En effet, le passage de facteurs d'initiation des ribosomes vers le surnageant S 150 devrait accroître l'activité

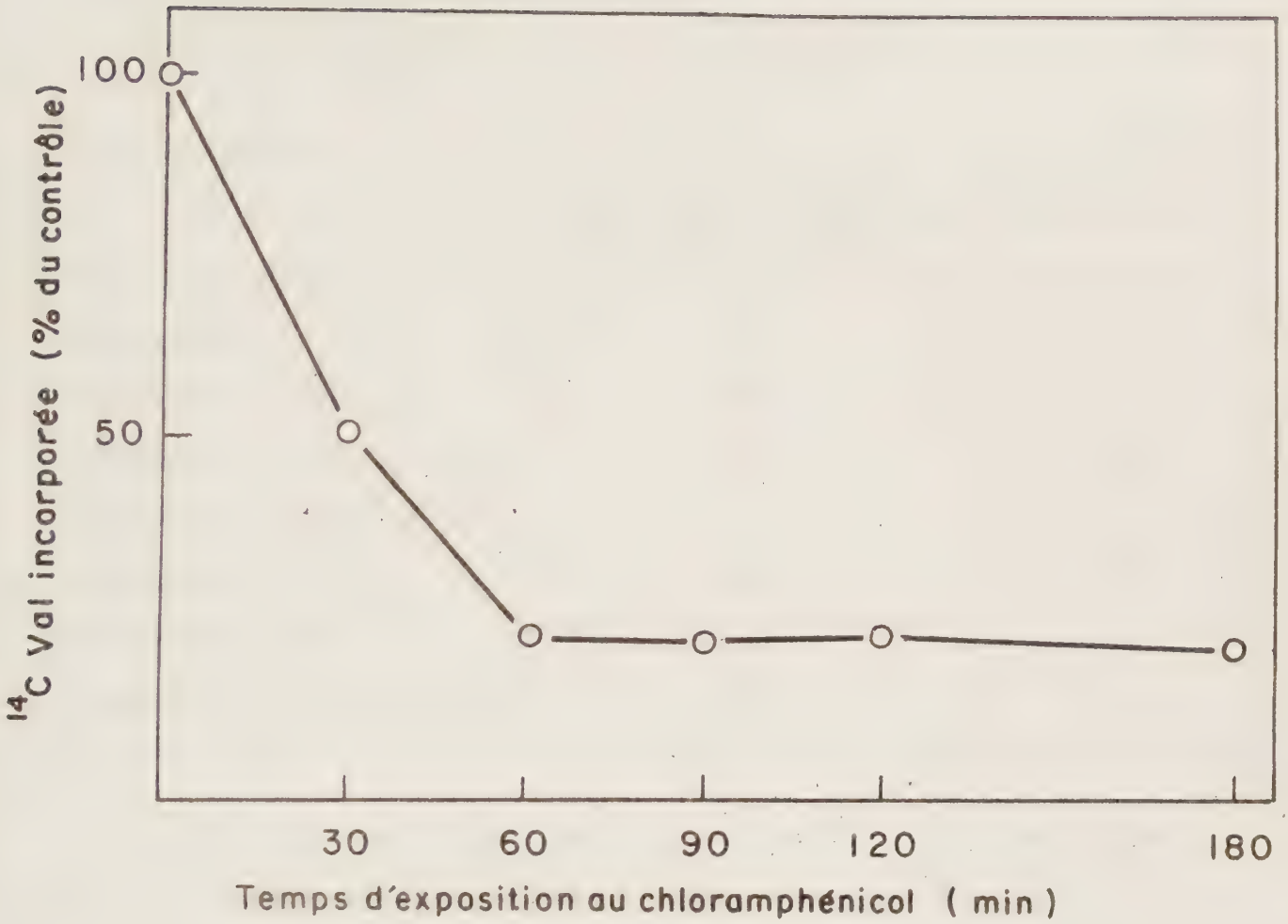


Figure 32 : INFLUENCE DU TEMPS D'EXPOSITION DES CELLULES AU CHLORAMPHENICOL SUR L'ACTIVITE DE LEURS RIBOSOMES DANS LA TRADUCTION IN VITRO DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4

Les ribosomes ont été extraits de cellules de la souche MRE 600 incubées pendant des temps différents en présence de 100 µg/ml de chloramphénicol. La mesure de leur activité a été effectuée dans les conditions décrites dans le tableau IX en utilisant pour chaque essai environ 0.7 unités A260 nm de ribosomes. Les résultats ont été normalisés dans la détermination des activités spécifiques. 100 % indique l'activité des ribosomes extraits de cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance.

TABLEAU XIII

EFFETS DES FACTEURS D'INITIATION SUR LES RIBOSOMES DE CELLULES TRAITEES PAR LE CHLORAMPHENICOL

Addition	pmoles de valine incorporée par A260 nm unité de ribosomes	Stimulation
Ribosomes	32	1.0
Ribosomes + IF brut	124	3.9
Ribosomes + fraction AS2	105	3.3
Ribosomes + fraction AS1	34	1.1
Ribosomes + IF 3	107	3.4
Ribosomes + IF 2	49	1.5
Ribosomes + IF 1	30	0.9

Les ribosomes utilisés sont obtenus à partir de cellules traitées 180 minutes par le chloramphénicol (100 µg/ml). Ces ribosomes ont été lavés dans le tampon II selon les conditions indiquées dans le tableau IX.

La préparation de la fraction AS1 est obtenue à partir de l'extrait brut de facteurs d'initiation décrite dans le tableau XI. Cet extrait est amené à 30 % de saturation en $(NH_4)_2 SO_4$. Le précipité est éliminé et le surnageant est précipité à 45 % de saturation du $(NH_4)_2 SO_4$. Le précipité obtenu est dissous et dialysé contre le tampon IV (Tris, 10 mM, pH 7.5; β-mercaptoethanol, 7 mM). Cette fraction appelée AS1 contient principalement le facteur IF 2. Le surnageant provenant de la précipitation de AS1 est amené à 80 % de saturation de $(NH_4)_2 SO_4$ et le culot est dissous et dialysé contre le tampon IV. Cette fraction est appelée AS2 et contient un mélange des facteurs IF 1 et IF 3.

Les facteurs très purifiés (IF 1, IF 2 et IF 3) ont été préparés selon le procédé décrit par Dubnoff et Maitra (366).

Le tableau indique le taux maximum de stimulation obtenu par addition des différentes préparations de facteurs d'initiation de la traduction du mRNA tardif de T4.

de ce dernier dans la traduction des mRNA naturels. Le tableau X indique que le surnageant S 150 extrait de cellules traitées par le chloramphénicol présente une activité dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4 très peu supérieure (10 % environ) à celle de surnageant extrait de bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance. De plus, ce léger accroissement de l'activité est observé dans la synthèse de polyphénylalanine effectuée en présence d'une concentration élevée en magnésium (20 mM), dans un milieu d'incubation où la formation d'un complexe mimant un complexe d'initiation à partir d'acétyl phe-tRNA et de facteurs d'initiation, n'est pas assurée. Dans ces conditions, l'addition de facteurs d'initiation est donc sans effet sur la traduction du poly U. Enfin, nous avons observé que le surnageant S 150 extrait de cellules traitées par le chloramphénicol était incapable de stimuler, en présence des facteurs IF 1 et IF 2, la traduction des mRNA réalisée par des ribosomes dépourvus de facteurs d'initiation endogènes.

Le tableau XIV montre que les ribosomes de cellules traitées par le chloramphénicol présentent une capacité réduite à former des complexes d'initiation, alors que ceux provenant des cellules des souches PA 1 (Rel A^-) et PA 2 (Rel A^+) carencées en arginine, ne sont pas affectés. L'addition de facteurs d'initiation exogènes permet de restaurer complètement cette activité (tableau XV) et stimule préférentiellement les ribosomes de cellules traitées par l'antibiotique par rapport à ceux présents dans les bactéries en croissance exponentielle.

TABLEAU XIV

ACTIVITE DE RIBOSOMES EXTRAITS DE CELLULES TRAITEES PAR LE CHLORAMPHENICOL OU CARENCEES EN ACIDE AMINE, DANS LA FORMATION DU COMPLEXE D'INITIATION

Origine des ribosomes	Fixation de fMet-tRNA			
	dirigée par poly (A U G)		dirigée par les mRNA tardifs de T4	
	pmoles de fMet-tRNA fixées	% du contrôle	pmoles de fMet-tRNA fixées	% du contrôle
Exp. 1 souche MRE 600				
non traitées	3.40	100	1.17	100
+ CAM	1.10	32	0.43	37
Exp. 2 souche PA 2				
non carencée	2.54	100	1.20	100
carencée en arg.	1.90	74	1.16	97
Exp. 3 souche PA 1				
non carencée	2.53	100	1.18	100
carencée en arg.	1.80	71	0.83	70

Le fMet tRNA marqué au tritium a été préparé selon les conditions décrites par Lelong et coll. (367). Le produit final était formylé à plus de 90 %.

La formation du complexe d'initiation dirigée par le poly (A,U,G,) a été réalisée dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant dans le tampon TMN 5 (Tris HCl, pH 7.5, 50 mM; NH_4Cl 80 mM; Mg $(OAc)_2$ 5 mM; β-mercaptoéthanol, 7 mM) : GTP 0,05 pmoles; ^{3}HfMet tRNA, 1.2 unité A260 nm; p A,U,G, 0.3 unité A260 nm; ribosomes 1 unité A260 nm. L'incubation est effectuée à 25° C pendant 10 minutes et la radioactivité retenue sur millipore est déterminée dans les conditions décrites par Lelong et coll. (367).

La formation du complexe d'initiation dirigée par le mRNA de T4 a lieu dans 50 µl de tampon TMN 8 (Tris HCl, pH 7.5, 50 mM; NH_4Cl, 80 mM; Acétate de magnésium, 8 mM; β-mercaptoethanol, 7 mM) contenant 0,05 pmoles de GTP; 1.2 unité A260 nm ^{3}HfMet tRNA; 100 µg de RNA tardif de phage T4. 1 unité A260 nm de ribosome. L'incubation est réalisée à 37° C pendant 15 minutes. La radioactivité est mesurée par rétention sur filtre millipore selon les conditions décrites par Lelong et coll. (367).

Quand nous l'avons indiqué, les ribosomes ont été extraits de bactéries soumises au traitement par le chloramphénicol ou carencées en arginine pendant 180 minutes.

TABLEAU XV

STIMULATION PAR LES FACTEURS D'INITIATION DES RIBOSOMES DE CELLULES TRAITEES AU CHLORAMPHENICOL, DANS LA FIXATION DU fMet tRNA DIRIGEE PAR LE mRNA TARDIF DE T4

Origine des ribosomes	pmoles de fMet-tRNA		% de contrôle		Stimulation
	O IF	+ IF	O IF	+ IF	
Cellules non traitées	2.36	2.70	100	110	1.1
Cellules + CAM	0.84	2.14	35	91	2.6

Les cellules ont été traitées par le chloramphénicol pendant 120 minutes. Les ribosomes ont été lavés par le tampon II uniquement. Les préparations brutes de facteurs d'initiation ont été obtenues à partir de cellules en croissance exponentielle. 100 % d'activité définit le taux de fixation du fMet tRNA sur les ribosomes de cellules non traitées par l'antibiotique sans addition de facteurs d'initiation exogènes. La formation du complexe d'initiation a été réalisée selon les conditions décrites dans le tableau XIV.

3 - Etude des facteurs d'initiation isolés à partir de bactéries traitées par les antibiotiques ou carencées en acide aminé.

Les facteurs d'initiation provenant de cellules traitées dans les différentes conditions d'inhibition de la traduction in vivo ont été extraits des ribosomes à l'état brut (NH_4Cl M/1) et leur activité dans la formation du complexe d'initiation ou dans la traduction des mRNA naturels, a été mesurée.

Le tableau XVI montre que l'activité résiduelle des facteurs d'initiation de bactéries traitées par le chloramphénicol (IF-CAM) est de 23 %. Par contre, les facteurs d'initiation extraits de cellules carencées en arginine ou incubées en présence de puromycine, sont aussi efficaces que ceux émanant de bactéries en phase exponentielle, pour la traduction des mRNA tardifs du bactériophage T4.

Nous avons pu vérifier que les préparations d'IF-CAM ne contenaient pas d'inhibiteur de la traduction. En effet, leur addition à des ribosomes complémentés, en quantité saturante, par des facteurs d'initiation de cellules en croissance exponentielle ne modifie pas le taux de synthèse protéique.

Cette réduction de l'activité globale des extraits contenant l'IF-CAM se retrouve dans leur capacité à former les complexes d'initiation de la traduction dirigés par les mRNA tardifs du phage T4 ou le RNA du phage Q_β (tableau XVII). En revanche, cette inhibition est faible si l'on mesure l'activité des facteurs IF-CAM dans l'initiation dirigée par le poly (A,U,G).

TABLEAU XVI

ACTIVITES COMPAREES DES FACTEURS D'INITIATION EXTRAITS DE BACTERIES TRAITEES PAR LES ANTIBIOTIQUES OU CARENCEES EN ARGININE ET DE BACTERIES EN CROISSANCE EXPONENTIELLE

Traitement des cellules	% activité
Cellules non traitées	100
PA 2 + CAM 180 minutes	23
PA 2 carencée en arginine	91
PA 1 carencée en arginine	89
AS 19 + puromycine 120 minutes	91

L'activité dans la traduction a été estimée par l'incorporation de ^{14}C valine au cours de la synthèse protéique dirigée par le RNA tardif du phage T4. 100 % est l'activité des facteurs d'initiation par A260 nm unité de ribosome de cellules contrôle de chaque expérience. L'activité est estimée sur les courbes obtenues par l'addition de quantité limitante de facteurs d'initiation. Cette activité mesurée permet le calcul de l'activité totale des facteurs d'initiation rapportée aux quantités de ribosomes dont ils ont été extraits.

TABLEAU XVII

EFFETS DES FACTEURS D'INITIATION EXTRAITS DE BACTERIES TRAITEES PAR UN ANTIBIOTIQUE OU CARENCEE EN ACIDE AMINE SUR LA FORMATION DU COMPLEXE D'INITIATION DE LA TRADUCTION

Traitement des bactéries	Poly (A U G)	Fixation du fMet-tRNA dirigée par	
		T4 mRNA	Q β RNA
Cellules non traitées	100	100	100
PA 2 + CAM 180 minutes	72.5	41.0	36
PA 2 carencée en arginine (180 minutes)	70.0	71.0	
PA 1 carencée en arginine (180 minutes)	70.0	78.0	
AS 19 + puromycine (120 minutes)	70.0	75.0	

Les milieux d'incubation contiennent, dans un volume total de 50 µl, 1 unité A260 nm de ribosomes. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité des facteurs d'initiation par unité de ribosomes de cellule contrôle et a été calculée comme nous l'avons indiqué dans le tableau XVI.

Les conditions d'incubation de la traduction du RNA de Qβ sont identiques à celles décrites pour le mRNA de T4 (tableau XIV).

Les compositions des différents milieux réactionnels sont identiques à celles définies dans le tableau XIV.

Cette observation confirme la proposition selon laquelle c'est la fonction du facteur IF 3 qui est principalement affectée. En effet, les complexes d'initiation dirigés par le poly (A,U,G) sont essentiellement dépendants des facteurs IF 1 et IF 2 et sont peu stimulés par le facteur IF 3. Par contre, ce dernier est requis dans l'initiation programmée par les mRNA naturels.

Les préparations de facteurs d'initiation formées à partir de bactéries traitées par la puromycine ou carencées en acide aminé (Rel A^+ et Rel A^-) présentent une perte d'activité réduite dans la formation des complexes d'initiation dirigés à la fois par le poly (A,U,G) et les mRNA naturels. Cette faible inhibition est, néanmoins, supérieure à celle que ces mêmes préparations présentaient dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4 (tableau XVI). Il est possible que le système d'essai qui permet de mesurer les complexes d'initiation formés privilégie de fait la mesure d'activité des facteurs IF 1 et IF 2. La mesure du taux de synthèse protéique dirigée par les mRNA naturels permettent, par contre, d'apprécier les concentrations relatives dans les échantillons testés du facteur IF 3, celui-ci étant limitant dans la réaction.

L'utilisation des mRNA tardifs de T4 dont on sait qu'il contient le messager responsable de la formation du lysosyme du bactériophage, nous a permis de déterminer si les protéines synthétisées par les préparations de facteurs d'initiation étaient correctement traduites <u>in vitro</u>. Le tableau XVIII montre que la fidélité de la traduction est maintenue, l'activité du lysosyme formé rapportée à la quantité de protéines syn-

TABLEAU XVIII

EFFETS DES FACTEURS D'INITIATION EXTRAITS DE BACTERIES TRAITEES PAR LES ANTIBIOTIQUES OU CARENCEES EN ACIDE AMINE SUR L'ACTIVITE DU LYSOSYME SYNTHETISE IN VITRO

Traitement des cellules	Activité lysosyme (1) CPM valine incorporée		IF cellules traitées / IF cellules contrôles
	IF de cellules contrôles	IF de cellules traitées	
PA 2 ± CAM 180 min.	0.78	0.68	0.87
PA 2 ± arg. 180 min.	0.73	0.87	1.18
PA 1 ± arg. 180 min.	0.80	0.78	0.98
AS19 ± puromycine 120 min	0.80	0.76	0.95

(1) unité de lysosyme arbitraire.

La synthèse protéique est dirigée par le mRNA tardif de T4. Le niveau d'activité du lysosyme est exprimée par le rapport quantité de lysosyme formé (exprimé en unités arbitraires et mesuré selon la technique décrite par Salser et coll. (359)) sur l'incorporation de valine ^{14}C dans les produits TCA insolubles à chaud.

Le milieu réactionnel contient dans 100 µl : 0.7 A260 nm unités de ribosomes, surnageant S 150 (300 µg) et facteur d'initiation en quantité saturante.

thétisées in vitro reste constante quelles que soient les préparations de facteurs d'initiation utilisées. Hall et Gallant (300) avaient proposé que la carence en acide aminé induisait spécifiquement chez les bactéries Rel A⁻ des erreurs de lecture des mRNA, cette défection provoquant, notamment, l'accumulation de molécules de β galactosidase modifiées dans leur thermosensibilité. Cette proposition a été infirmée par les travaux de Block et Haseltine (301) et Hansen et coll.(302) qui concluent à une modification au niveau du processus de transcription pour rendre compte du phénomène décrit. Nous n'avons pas observé de variation dans la fidélité de lecture des mRNA tardifs de T4 codant pour le lysosyme par la machinerie de traduction de cellules Rel A⁻ carencées en acide aminé. En effet, nous avons vérifié que non seulement les facteurs d'initiation, mais aussi les ribosomes des bactéries de la souche PA 1 (Rel A⁻) carencées en arginine synthétisent in vivo du lysosyme phagique avec une efficacité analogue à celle présentée par les ribosomes extraits de cellules en croissance exponentielle.

On doit noter que le degré d'inhibition de l'activité des facteurs d'initiation extraits de cellules incubées en présence de chloramphénicol varie selon la nature du message utilisé dans la traduction in vitro. Le tableau XIX montre que cette inhibition est plus prononcée dans la synthèse protéique dirigée par le RNA du phage Q_β ou les mRNA tardifs de T4 que dans celle contrôlée par le RNA du phage R 17. Une telle différence d'activité ne se manifeste pas lorsqu'on dose l'activité des facteurs d'initiation extraits de bactéries traitées par la puromycine ou carencées en arginine. Une observation analo-

TABLEAU XIX

ACTIVITE DES FACTEURS D'INITIATION DE CELLULES TRAITEES AUX ANTIBIOTIQUES OU CARENCEES EN ACIDE AMINE DANS LA TRADUCTION DE DIFFERENTS mRNA

Traitement des cellules	Activité dirigée par R 17 / Activité dirigée par T4	Activité dirigée par Qβ / Activité dirigée par T4
Cellules non traitées	1	1
PA 2 + CAM 180 min. (préparation n° 1)	2.25	1.04
PA 2 + CAM 180 min. (préparation n° 2)	1.80	
PA 2 carencée en arg. 180 min.	0.93	
PA 1 carencée en arg. 180 min.	0.91	
AS 19 + puromycine 120 minutes	1.06	

Pour la préparation n° 1 de cellules traitées par le chloramphénicol, chaque valeur est la moyenne de quatre déterminations différentes.

L'activité relative de facteurs d'initiation de cellules contrôle pour des mRNA différents est utilisée comme unité. Chaque essai (100 µl) contient 0.8 A260 nm unité de ribosome lavés dans le tampon III (contenant du chlorure d'ammonium 1 M), 250 µg de surnageant S 150 et des facteurs d'initiation en quantité saturante.

gue a été reportée par Scheps et Revel (303) au cours de l'étude des facteurs d'initiation de cellules maintenues en phase stationnaire. Ces résultats pourraient indiquer une variation dans la stabilité des différentes classes qui composent la population des facteurs IF 3. Il faudrait alors émettre l'hypothèse que la classe de molécules de IF 3 qui traduit préférentiellement le RNA du phage R 17 est plus stable au traitement des cellules par le chloramphénicol, que la classe de protéines IF 3 responsable de la traduction des mRNA tardifs de T4 ou du RNA du phage Q_β : de fait, on sait que selon les quantités relatives de molécules de facteur i (protéine S 1 de la sous-unité 30 S) et de facteur IF 3, l'affinité des ribosomes pour différents mRNA parait être modifiée (233). On peut donc penser que la perte d'activité du facteur IF 3 qui résulte du traitement des bactéries par le chloramphénicol, en augmentant le rapport protéine S 1/facteur IF 3 déterminerait des variations dans l'efficacité de traduction in vitro de différents mRNA.

4 - Inhibition in vitro de l'activité des facteurs d'initiation.

Dans une cellule en croissance exponentielle, les facteurs d'initiation sont normalement associés à la sous-unité 30 S du ribosome. Dès leur dissociation provoquée par la formation du complexe d'initiation sur le monosome 70 S (304,305), ils vont se localiser sur d'autres sous-unités qui deviennent natives, assurant ainsi le fonctionnement normal du cycle ribosomique. Une incubation prolongée des cellules en présence de chloramphénicol pourrait donc induire l'accumulation des fac-

teurs d'initiation dans une phase soluble, au cours de laquelle les molécules de IF 3 seraient principalement inactivées.

Afin de déterminer les mécanismes responsables de cette inactivation, nous avons étudié la stabilité des facteurs d'initiation dans un système in vitro. Quand une préparation brute de facteurs d'initiation est préincubée à 37° C, on observe une perte de l'activité dans la traduction du mRNA de T4 en fonction du temps. Selon les expériences, le taux régissant cette chute d'activité varie de 50 % à 80 % (figure 33 et tableau XX). L'addition au cours de la préincubation de surnageant S 150 provenant de cellules en phase exponentielle ou de S 150 extraits de bactéries traitées par le chloramphénicol ne modifie pas la cinétique de cette perte d'activité (tableau XX). Par ailleurs, la préincubation dans les mêmes conditions de ribosomes extraits dans le tampon II, qui possèdent donc leur équipement en facteurs d'initiation, n'entraîne pas de modification de leur capacité à traduire les mRNA naturels (figure 33). Enfin, l'addition de ribosomes 70 S, de sous-unités 30 S+ 50 S ou de sous-unités 30 S, traités par le tampon III, protège les facteurs d'initiation de cette perte d'activité à 37° C (figure 33 et tableau XX).

Par des expériences de complémentation, nous avons pu montrer en utilisant des quantités variables de facteurs d'initiation purifiés que seul IF 3 pouvait restaurer l'activité des facteurs d'initiation incubés pendant 120 minutes à 37° C (tableau XXI).

Nous avons recherché si cette diminution d'activité qui est stimulée par la présence de magnésium (figure 34), pouvait résulter d'une dégradation de IF 3 induite par une

TABLEAU XX

ACTIVITE D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION AU COURS D'UNE INCUBATION A 37° C

Expérience	pmoles de valine incorporée par A260 nm unité de ribosomes			% activité résiduelle		
	0 min.	30 min.	60 min.	0 min.	30 min.	60 min.
IF brut	53.0	34.4	24.0	100	65	58
IF brut + S 150	59.0	43.0	34.0	100	65	45
IF brut + S 150 CAM	73.0	53.0	42.0	100	72	58
IF brut + ribosomes lavés dans le tampon III	65.0	53.0	54.1	100	82	83

Le milieu de préincubation pour les expériences d'inactivation des facteurs d'initiation est le suivant : 200 µl de milieu réactionnel contient : Tris HCl, pH 7.8, 10 mM, ß-mercaptoethanol, 7 mM; NH_4Cl, 60 mM, Acétate de magnésium, 10 mM; préparation brute de facteurs d'initiation extraits de cellules en croissance exponentielle : 300 µg. Quand nous l'indiquons, le milieu contient 13.5 unités A260 nm de ribosomes lavés dans le tampon III, 500 µg de surnageant S 150 provenant de cellules en croissance exponentielle, 800 µg dessurnageant S 150 de cellules traitées 180 minutes par le chloramphénicol.

Chaque essai d'incubation (100 µl) pour la détermination de l'activité de la traduction des mRNA tardifs de T4 contient 10 µl de la préincubation décrite ci-dessus. Les autres composants sont additionnés selon la méthode de Salser et coll. (359). La composition finale est la même pour chaque essai (complémentation en ribosome, S 150 ...). Dans tous les cas, les préparations brutes de facteurs d'initiation sont utilisées dans des quantités limitantes.

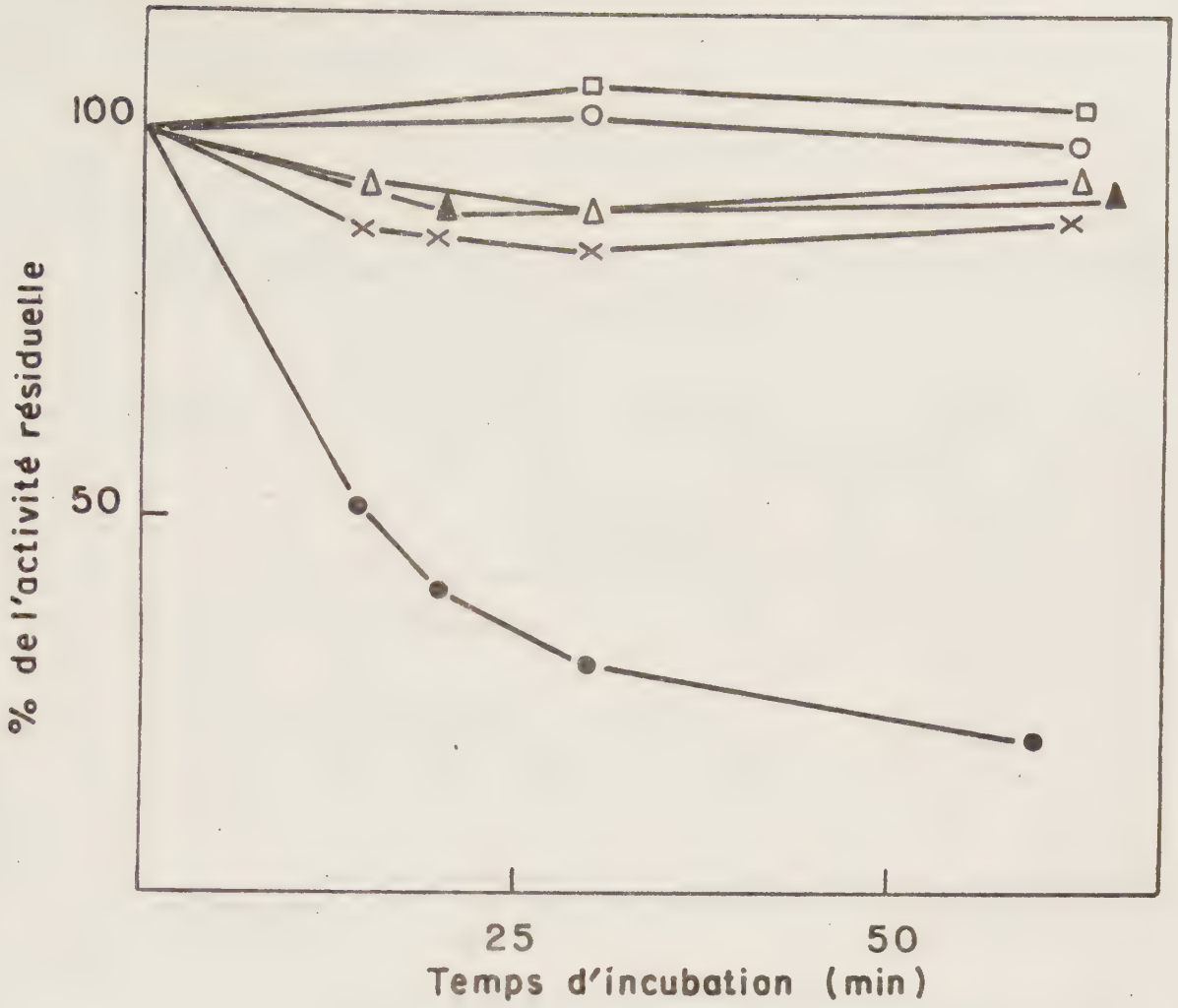


Figure 33 : INHIBITION DE L'ACTIVITE DES FACTEURS D'INITIATION AU COURS D'UNE INCUBATION A 37° C ET PROTECTION PAR LES RIBOSOMES

Les conditions d'incubation et de synthèse protéique sont décrites dans le tableau XX. 100 % représente l'activité au temps zéro d'incubation pour chaque essai. Dans les expériences réalisées en présence de ribosomes, ceux-ci ont été ajoutés en excès par rapport à la quantité d'extrait brut de facteurs d'initiation. Tous les échantillons ont été normalisés afin d'obtenir la même composition finale dans les milieux d'incubation de la synthèse protéique. Les sous-unités ribosomiques ont été utilisées après traitement par le tampon III (Tris, 10 mM, pH 7.5; NH_4Cl, 1 M; Acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol, 7 mM).

●——● extrait brut de facteurs d'initiation incubé à 37° C, ▲——▲ ribosomes 70 S préparés dans le tampon II (Tris, 10 mM, pH 7.5; NH_4Cl, 60 mM; acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol, 7 mM, □——□ extrait brut de facteurs d'initiation + sous-unités 30 S; O——O, extrait brut de facteurs d'initiation + sous-unités 30 S + 50 S; Δ——Δ ribosomes 70 S traités par le tampon III; X——X extrait brut de facteurs d'initiation + ribosomes 70 S traités par le tampon III.

TABLEAU XXI

RESTAURATION DE L'ACTIVITE D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEUR D'INITIATION INCUBE A 37° C

	% d'activité			
	sans addition	+ IF1	+ IF2	+ IF3
IF brut non préincubé	100	100	100	100
IF brut préincubé, 37° C, 120 min.	54	51	38	88

Les préparations brutes de facteurs d'initiation ont été préincubées à 40° C pendant 120 minutes dans les conditions de milieu décrites tableau XX.

Les facteurs purifiés IF 1, IF 2 et IF 3 ont été utilisés aux concentrations requises pour un niveau maxima de stimulation.

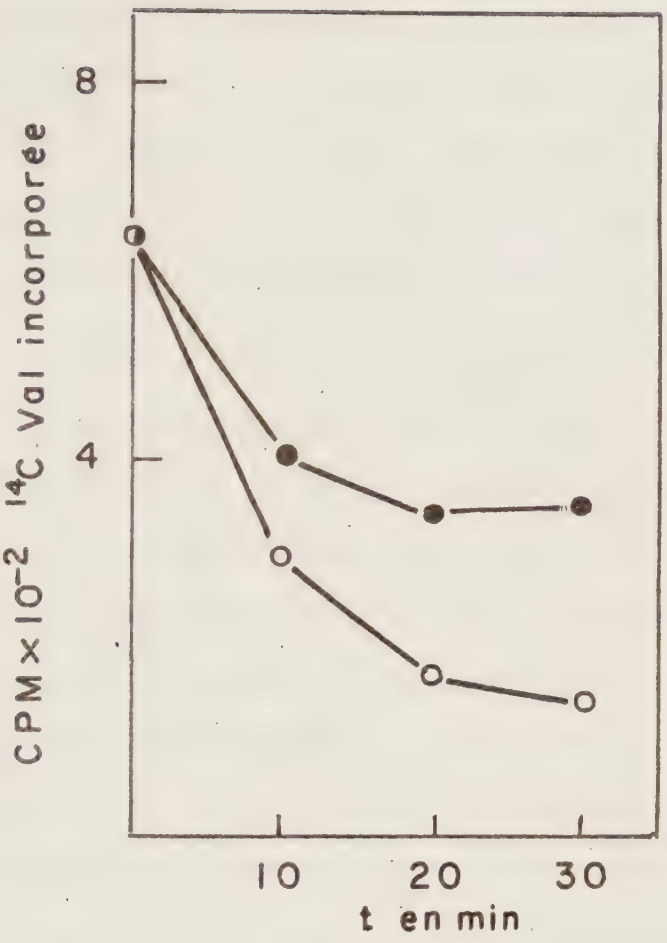


Figure 34 : INFLUENCE DU MAGNESIUM SUR L'INACTIVATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION INCUBE A 37° C

Un extrait brut de facteurs d'initiation est préincubé à 37° C dans le tampon IV (Tris HCl, 10 mM, pH 7.5; β-mercaptoethanol 7 mM) en absence (●———●) ou en présence d'acétate de magnésium 10 mM (O———O). L'activité des facteurs d'initiation est mesurée dans le système de traduction des mRNA tardifs du phage T4. L'extrait brut de facteur d'initiation est en quantité limitante dans le système de synthèse protéique. La composition du milieu d'incubation de la traduction est identique pour tous les essais.

protéase. On sait, par exemple, qu'au cours de l'infection par le bactériophage T7, ce facteur est dégradé par une enzyme protéolytique sensible à l'action du phénylméthane sulfonylfluorid (PMSF)(233). Cette dégradation est suffisante pour entraîner la perte de la détection des motifs antigéniques de la molécule par l'anticorps dirigé contre ce facteur (233).

La figure 35 montre que l'addition de PMSF ne modifie pas la perte de capacité des facteurs d'initiation à traduire le mRNA tardif de T4 ou à former les complexes d'initiation dirigés par ce messager. De plus, par la méthode de diffusion simple à une dimension en tube (méthode de Oudin (306)), nous avons pu montrer qu'il n'y avait pas de disparition des motifs antigéniques de la protéine IF 3 au cours de la préincubation à 37° C, que celle-ci ait été réalisée en présence ou en absence de PMSF (figure 36). Cette technique immunologique basée sur la réaction de précipitation en milieu gélifié permet, dans les conditions que nous décrivons dans la légende de la figure 36, la diffusion de l'antigène, présent dans la phase liquide, au travers de la gélose contenant l'anticorps. Pour une durée donnée de la réaction, la hauteur de la zone de précipitation est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'antigène.

On sait, par ailleurs, que le facteur IF 3 à l'état purifié est thermostable, nous l'avons vérifié dans nos conditions expérimentales(figure 37 D). On peut alors proposer que l'inhibition de l'activité de IF 3 soit induite par un composant différent du facteur et présent dans la préparation des extraits bruts. Nous avons mesuré l'évolution de l'activité

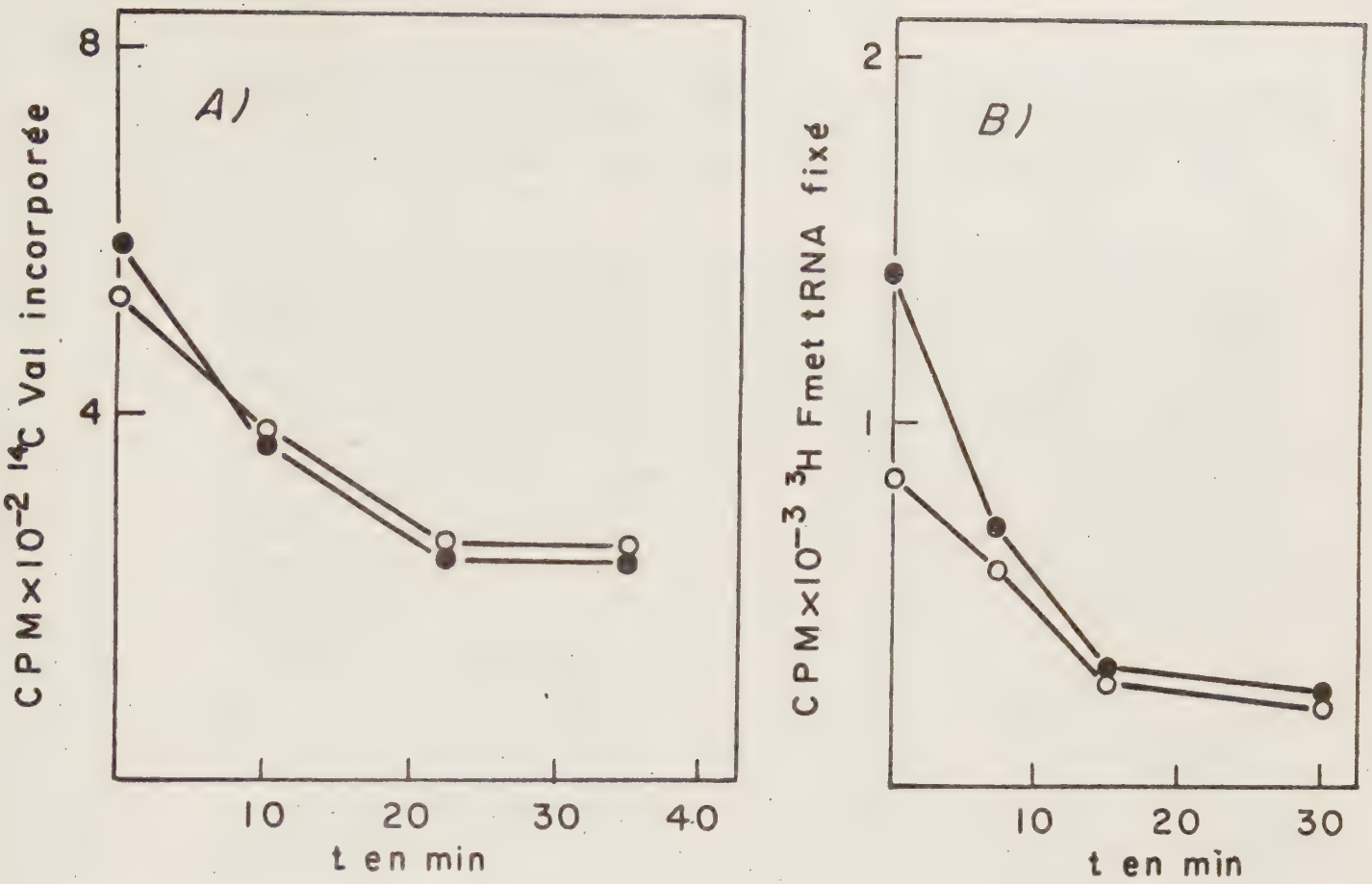


Figure 35 : ACTIVITES DES FACTEURS D'INITIATION EN PRESENCE DE PHENYL METHYL SULFONYL FLUORIDE (PMSF)

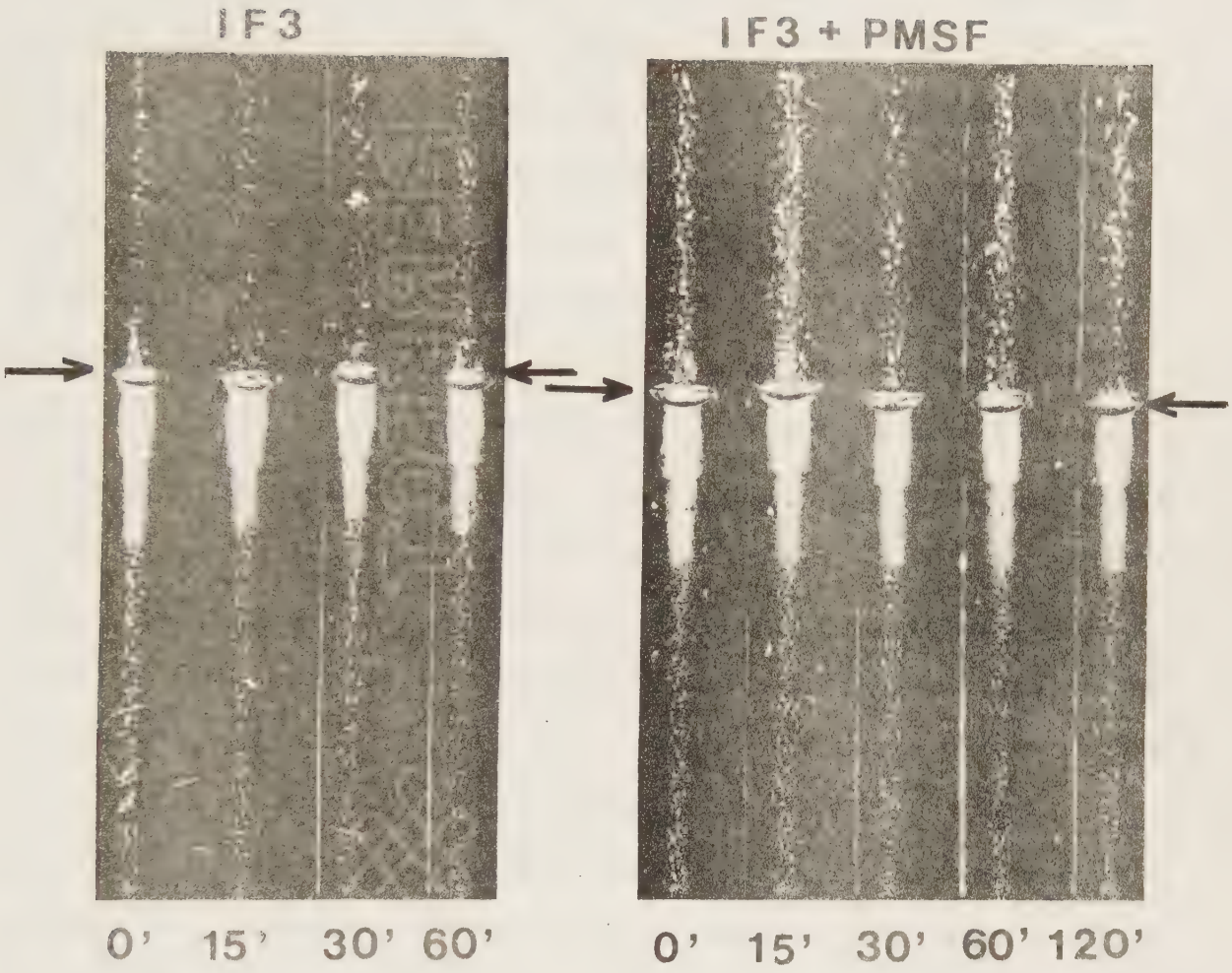
Un extrait brut des facteurs d'initiation est préincubé à 37° C dans un tampon contenant : Tris HCl, 10 mM; pH 7.5; acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol 7 mM. Une fraction de cet extrait est préincubée en présence de 6 x 10^{-4}M de PMSF. Des échantillons de ces préincubations sont testés dans la synthèse protéique (graphique A) ou dans la formation du complexe d'initiation (graphique B) dirigées par les mRNA tardifs du phage T4. Les extraits bruts de facteurs d'initiation sont utilisés en quantité limitante dans tous les tests d'activité. Les conditions de synthèses protéiques et de formation des complexes d'initiation sont celles décrites dans les tableaux XX et XVI respectivement.

●——● préincubation de l'IF en présence de PMSF

O——O préincubation de l'IF en absence de PMSF.

Figure 36 : DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DU FACTEUR IF 3 AU COURS DE L'INCUBATION DE L'EXTRAIT BRUT DE FACTEUR D'INITIATIVE A 37° C.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion simple à une dimension en tube décrite par Oudin (306,361). Un tube de 2 mm de diamètre et de 8 centimètres de large est rempli à moitié par l'antisérum dirigé contre le facteur IF 3 dilué au 2/3 dans de la gelose 0.2 %. La préparation d'extraits bruts de facteur d'initiation est en milieu liquide dans du sérum physiologique (NaCl 9 °/₀₀). Les tubes sont bouchés par la piceine (mélange de paraffine et de gomme). L'interface se situe au milieu du tube qui contient 4 cm de gelose et 4 cm de phase liquide. Nous nous sommes placés dans des conditions d'excès d'antigène afin d'observer une diffusion de celui-ci dans la phase gélifiée contenant l'immunsérum. Pour une durée déterminée, la pénêtration de l'antigène dans la gelose est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'antigène et inversement proportionnelle au logarithme de la concentration de l'anticorps la hauteur $H = k \log AG$. K définit les propriétés telles que la température, les coefficients de diffusion de l'antigène, la viscosité, autant de paramètres qui restent constants pendant la durée de l'expérience. Les concentrations de l'anticorps utilisé sont les mêmes dans tous les tubes. La réaction a été photographiée après 7 jours d'incubation, les tubes étant maintenus dans une chambre thermostatée à 20° C. La photographie A représente le dosage antigénique du facteur IF 3 au cours d'une incubation de l'extrait brut de l'IF à 37° C. La photographie B représente ce même dosage effectué sur un extrait brut d'IF incubé en présence de PMSF. Les incubations ont été réalisées dans les conditions décrites dans la figure 35. Les dosages ont été effectués sur des fractions aliquots de volume identique, prélevées à des temps différents des incubations entre 0 et 120 min. L'antisérum dirigé contre le facteur IF 3 a été préparé par Jean Thibault.


IF3
IF3 + PMSF
0' 15' 30' 60'
0' 15' 30' 60' 120'

de molécules purifiées de IF 3 lorsque celles-ci sont ajoutées à un extrait brut incubé pendant 30 minutes. Cette activité a été déterminée à la fois dans la traduction et la formation des complexes d'initiation dirigés par le mRNA tardif de T4 (figures 37A et 37B). L'activité restaurée par l'addition de IF 3 n'est que très peu modifiée au cours d'une incubation prolongée à 37° C. On peut alors considérer que le composant responsable de la perte d'activité de IF 3 est lui-même incapable, après 30 minutes de préincubation, d'induire l'inhibition de IF 3. L'addition de IF 3 au stade initial de la préincubation montre, en fait, que la perte d'activité globale du système est la même que dans un extrait brut non supplémenté : elle n'est pas supérieure à celle observée en absence de molécules de IF 3 purifiées (figure 37C). Tout se passe donc comme si les molécules de facteur IF 3 purifié que nous avons ajoutées à l'extrait brut n'étaient pas inactivées. La figure 37D montre en effet, qu'une préparation d'extrait brut de facteurs d'initiation est incapable d'inactiver au cours d'une préincubation le facteur IF 3 exogène. On peut alors émettre l'hypothèse que la perte de capacité de IF 3 au cours de la préincubation nécessite que cette protéine soit associée à d'autres composants qui participent à un complexe préformé dans la cellule et qui ne peut être modifié par l'addition de molécules de IF 3 exogènes.

Nous avons étudié l'effet de la préincubation à 37° C sur les composants AS 2, une sous-fraction de la préparation d'IF brut. La figure 38 montre que cette sous-fraction peut être inhibée, mais la cinétique de cette inhibition est plus lente que celle présentée par l'extrait brut de facteur d'initiation.

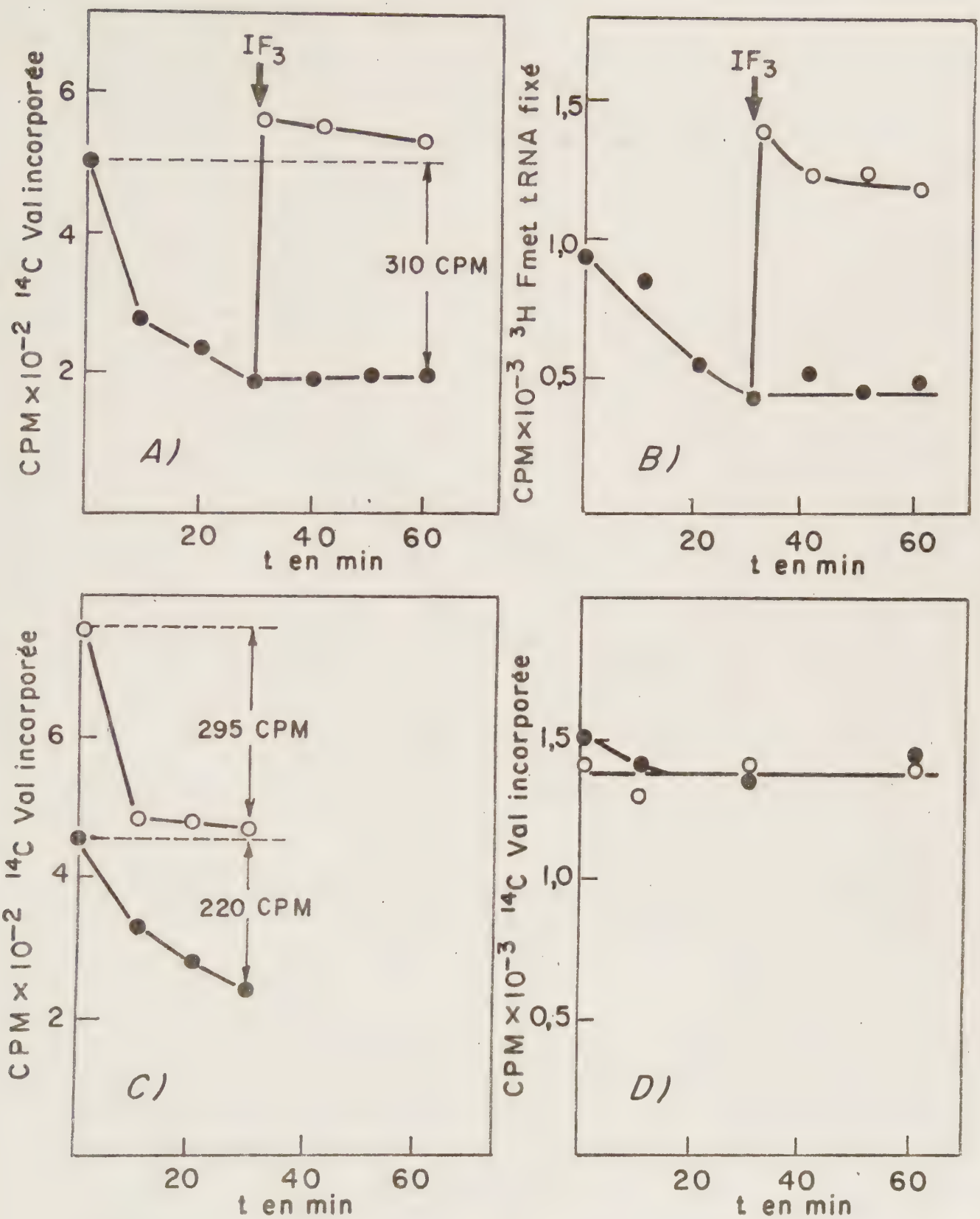
Figure 37 : ACTIVITE DU FACTEUR IF 3 PURIFIE PREINCUBE EN PRESENCE D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION

Un extrait brut de facteurs d'initiation a été préincubé à 37° C dans les conditions décrites précédemment (figure 33 ●——●) en présence d'une quantité de facteur exogène IF 3 purifié. L'addition du facteur IF 3 exogène est effectuée après 30 min. de préincubation de l'extrait brut d'IF (graphique A et B) ou au temps zéro de cette préincubation (graphique C). L'activité des facteurs d'initiation a été mesurée dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4 (graphiques A et C) ou dans la formation du complexe d'initiation dirigée par ces mêmes mRNA (graphique B).

Le graphique D présente l'activité du facteur IF 3 purifié préincubé seul ou en présence d'un extrait brut de facteurs d'initiation. Afin de mesurer cette activité, nous avons effectué trois préincubations A, B, C, dans le tampon Tris HCl, 30 mM, pH 7.5; NH_4Cl 40 mM; acétate de magnésium 10 mM; β-mercaptoethanol 5 mM. La préincubation A est faite en présence de 150 µg d'un extrait brut de facteurs d'initiation et de 2 µg de facteur IF 3 exogène; le milieu de la préincubation B contient l'extrait brut de facteur d'initiation et celui de la préincubation C le facteur IF 3 purifié. L'activité du facteur IF 3 préincubé dans le système de traduction des mRNA tardifs du phage T4 a été mesurée en déterminant la synthèse protéique dépendante de l'addition de fractions aliquots de volumes constants de la préincubation A (●——●) ou d'un mélange de préincubation B + C (O——O) afin que les concentrations finales en facteur d'initiation et en facteur IF 3 soient identiques dans tous les essais de traduction. Ces activités ont été déterminées en présence de 0.8 µg de facteur IF 1 purifié, non préincubé. Ces tests ont été effectués avec des quantités limitantes en facteurs d'initiation par rapport aux concentration des mRNA de T4, des ribosomes du surnageant S 150.

Les facteurs purifiés ont été obtenus selon les conditions décrites dans le tableau XXI. Les conditions d'incubation des systèmes *in vitro* de la traduction ou de la formation d'un complexe d'initiation dirigés par tous les mRNA tardifs de T4 sont celles décrites dans la figure 35.

Graphique A, B, C : ●——● préincubation d'un extrait brut d'IF; O——O préincubation d'un extrait brut d'IF + IF 3 purifié; graphique D : préincubation de IF 3 en présence d'un extrait brut d'IF, O——O préincubation de IF 3 purifié.


IF3
CPM×10−2 14C Val incorporée
310 CPM
A)
t en min
CPM×10−3 3H Fmet tRNA fixé
B)
295 CPM
220 CPM
C)
D)
20
40
60
2
4
6
0,5
1,0
1,5

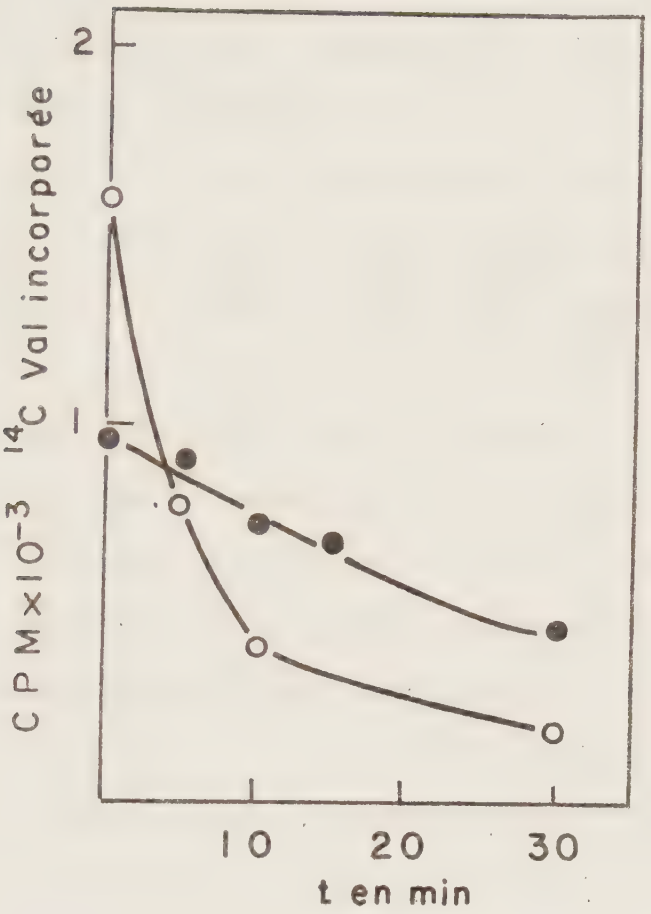


Figure 38 : INACTIVATION DE LA FRACTION AS 2 AU COURS D'UNE PREINCUBATION A 40° C

La fraction AS 2, étape de purification des facteurs d'initiation IF 1 et IF 3, a été préparée selon les conditions décrites dans le tableau XIII. Cette fraction est préincubée à 40° C en présence d'acétate de magnésium 10 mM. Parallèlement, un extrait brut de facteurs d'initiation a été préincubé à 40° C. Des fractions aliquotes des préparations AS 2 et de l'extrait brut d'IF ont été prélevées à des temps différents de préincubation et leur activité a été mesurée dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4. Les tests d'activité de la fraction AS 2 sont effectués en présence de 4 µg de facteur IF 2 purifié pour 50 µg de AS 2 dans 100 µl de milieu réactionnel. Le graphique montre l'activité de l'IF brut (●——●) et de la fraction AS 2 (O——O) en fonction du temps de préincubation à 40° C.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'addition d'ATP en présence d'un système régénérateur d'énergie (phosphoenol pyruvate et pyruvate kinase) augmentait rapidement la perte d'activité d'une préparation incubée à 37° C de facteurs d'initiation (figure 39 et tableau XXII). On ne peut attribuer cet effet à une neutralisation par l'ATP de cations divalents, les systèmes de traduction utilisés dans les expériences contrôles étaient ajustés à des concentrations d'ATP, de PEP et de PK identiques à celles présentes dans les tests d'inactivation des préparations de facteurs d'initiation préincubées. L'inhibition produite en présence d'ATP, de PEP et de PK, ne se manifeste pas dès lors que la préincubation est réalisée en présence de ribosomes (tableau XXII et figure 39). De plus, les expériences de complémentation par des facteurs purifiés montrent que le facteur IF 3 purifié est seul capable de restaurer complètement l'activité perdue (tableau XXIII). Néanmoins, on observe une stimulation par l'addition des facteurs IF 1 et IF 2 qui ne permet cependant pas de retrouver l'activité initiale, quelle que soit la quantité de ces facteurs purifiés que l'on ajoute. La combinaison de plusieurs facteurs montre que la présence de IF 3 est toujours nécessaire à la restauration complète de l'activité à un niveau analogue à celui de préparation de facteurs d'initiation non préincubées à 37° C et complémentées dans les mêmes conditions.

Nous avons vérifié, par ailleurs, en utilisant le test immunologique de Oudin (306) décrit plus haut, que le dosage des motifs antigéniques de IF 3 ne révélait pas de modifications quantitatives au cours d'une préincubation du facteur d'initiation en présence d'ATP, de PEP et de PK.

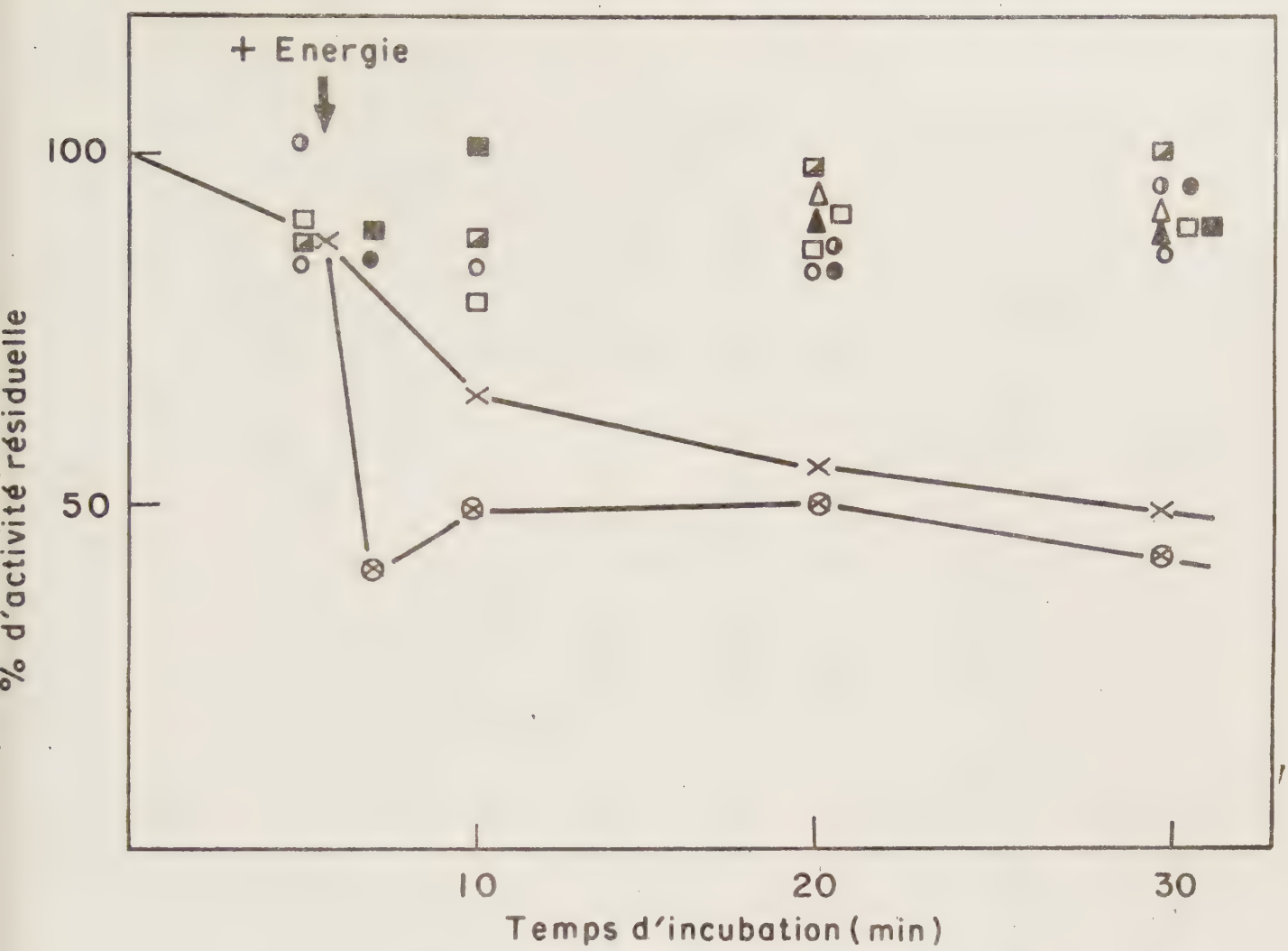


Figure 39 : EFFET DE L'ATP, PEP ET PK SUR L'INACTIVATION DES FACTEURS D'INITIATION IN VITRO

Les conditions de préincubation, d'incubation et de synthèse protéique utilisées sont celles décrites dans le tableau XXII. Les facteurs d'initiation ont été utilisés en quantité limitante. Dans tous les essais, les milieux d'incubations de la synthèse protéique in vitro ont la même composition (complémentation quand nécessaire d'ATP, PEP et PK...). On a mesuré l'activité dans la traduction de différents constituants au cours de leur préincubation à 37° C. Les milieux de préincubations contiennent :

1 - Des ribosomes extraits préparés dans le tampon II (Tris HCl, pH 7.5, 10 mM; NH_4Cl 60 mM; Acétate de magnésium 10 mM; β-mercaptoethanol 7 mM) en présence (▲——▲) ou en absence (Δ——Δ) d'un mélange ATP + PEP + PK;

2 - De ribosomes traités par le tampon III (Tris HCl, pH 7.5, 10 mM; NH_4Cl 1 M; acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol 7 mM) en présence (◪——◪) ou en absence (□——□) de mélange ATP + PEP + PK;

3 - Des ribosomes lavés dans le tampon III et un extrait brut de facteurs d'initiation incubés en présence (◐——◐) ou en absence (○——○) de mélange ATP + PEP + PK;

4 - De ribosomes traités par le tampon III (■——■), d'un mélange de ribosomes traités par le tampon III et d'un extrait brut de facteurs d'initiation (●——●), d'un extrait brut de facteurs d'initiation (⊘——⊘) auxquels on ajoute le mélange ATP + PEP + PK après 5 minutes de préincubation à 37° C;

5 - D'un extrait brut de facteur d'initiation préincubé sans addition du mélange ATP + PEP + PK (X —— X).

TABLEAU XXII

EFFET DE L'ENERGIE (ATP, PEP, PK) SUR L'INHIBITION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION DANS LA TRADUCTION DU mRNA

Expériences	pmoles de valine incorporée pour A260nm unité de ribosome			% activité résiduelle		
	0 min.	30 min.	60 min.	0 min.	30 min.	60 min.
N° 1						
IF brut	60.0	33.5	31.6	100	55	52
IF brut + énergie	36.2	34.7	35.4	60	57	58
N° 2						
IF brut	62.5	44.2	32.8	100	70	52
IF brut + énergie + S 150	44.2	44.3	35.4	70	71	57
N° 3						
IF brut + ribosomes	65.0	53.0	54.1	100	82	83
IF brut + ribosomes + énergie	59.5	64.5	58.5	92	99	90

Les conditions de préincubation sont celles définies dans le tableau XX, le milieu réactionnel a été complémenté par l'addition de pyruvate kinase 2 µg, ATP, 1 mM et phosphoenol pyruvate 2 mM.

La composition finale a été ajustée dans les essais de traduction du mRNA de T4 afin que chaque incubation contienne les mêmes constituants (complémentation en énergie : ATP, PEP, PK; en ribosome; en S150).

Le surnageant S 150 utilisé provient de cellules en croissance exponentielle. 500 µg de ce surnageant ont été ajoutés dans 200 µl de milieu de préincubation.

Les préparations de facteurs d'initiation ont été utilisées dans des quantités limitantes afin de déterminer leur activité dans la traduction du mRNA tardif de T4.

TABLEAU XXIII

COMPLEMENTATION PAR LES FACTEURS D'INITIATION PURIFIES D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEUR PREINCUBE EN PRESENCE D'ENERGIE (ATP + PEP + PK)

	% activité			
	sans addition	+ IF1	+ IF2	+ IF3
IF brut non préincubé	100	100	100	100
IF brut préincubé en présence d'ATP, PEP, PK	65	80	70	105

Un mélange de PEP, ATP et PK a été ajouté après 10 minutes de préincubation d'une préparation brute de facteurs d'initiation et l'activité a été mesurée après 40 minutes de préincubation supplémentaire.

Les compositions finales des milieux de préincubation et d'incubation sont celles décrites dans le tableau XXII.

Les facteurs purifiés IF 1, IF 2 et IF 3 ont été utilisés à des concentrations requises pour obtenir un taux maximum de stimulation.

L'activité est mesurée dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4.

Hurwitz et coll. (307) avaient décrit dans les extraits d'Escherichia coli une activité enzymatique RNA dépendante, responsable de la synthèse in vitro d'un polyadénylate à partir d'ATP exogène. Nous avons vérifié que l'effet inhibiteur dû à l'addition de l'ATP dans les extraits bruts de facteurs d'initiation, ne résultait pas de l'accumulation de poly A. En effet, on n'observe pas d'incorporation de ^{32}P dans un produit TCA insoluble à froid au cours d'une préincubation de ces extraits en présence d'ATP $\alpha\,^{32}P$ (figure 41). De plus, l'addition de poly A (jusqu'à une concentration égale à 200 µg/ml de milieu réactionnel) dans le système de traduction des mRNA tardifs du phage T4, n'entraîne pas une perte d'efficacité de l'incorporation de ^{14}C Valine dans les protéines synthétisées in vitro (figure 40).

On pouvait supposer que l'inhibition observée en présence d'ATP et d'un système générateur d'énergie résulte de la phosphorylation d'un composant présent dans l'extrait brut de facteurs d'initiation. L'addition de ATP $\gamma\,^{32}P$ dans le milieu de préincubation induit d'ailleurs la formation d'un produit marqué TCA insoluble (figures 41 et 42).

Dès lors, il était important de rechercher si cette "incorporation" était liée à la perte d'activité du facteur IF 3 qui accompagne une préincubation de l'extrait brut à 37° C. Cette "incorporation" est strictement dépendante de la présence de magnésium (figure 42) dont la concentration optimale est de 12 mM $MgCl_2$; la réaction a été observée pour des concentrations en magnésium comprises entre 3 et 20 mM, l'activité aux valeurs extrêmes représentant 60 % du taux d'incorporation optimal.

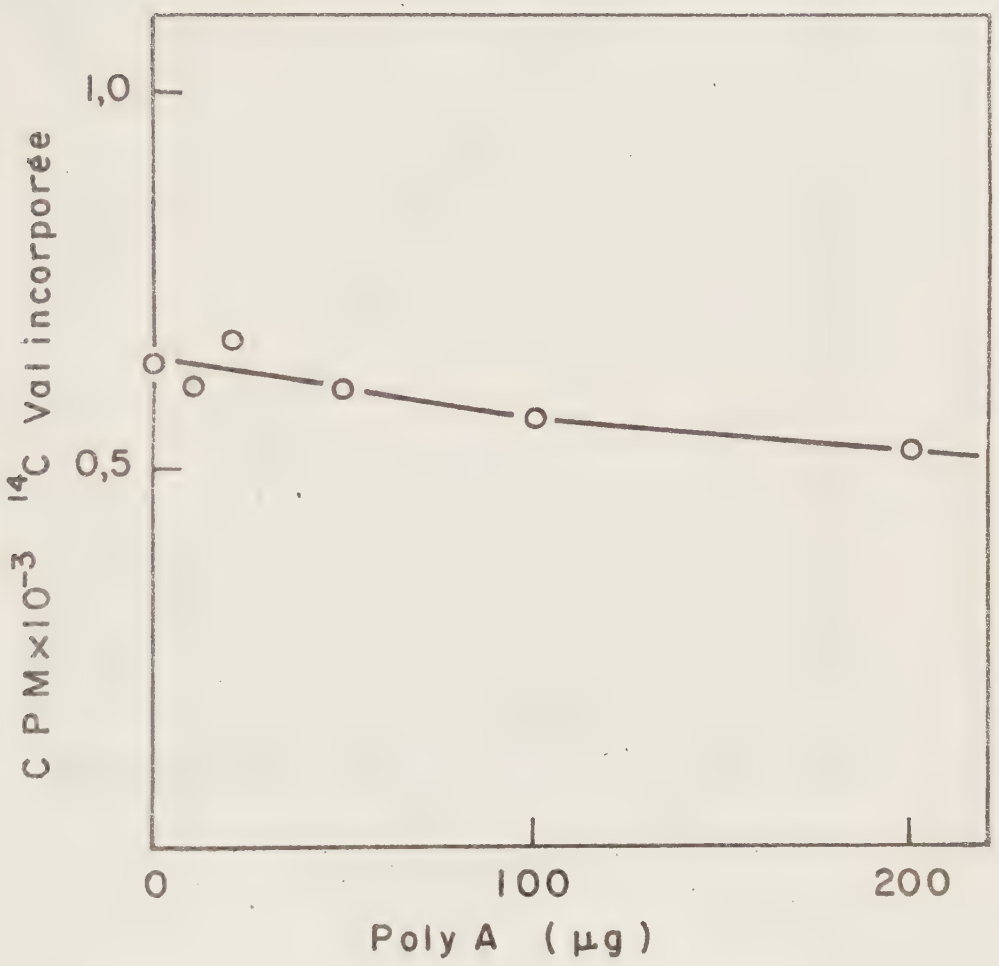


Figure 40 : EFFET DE L'ADDITION DE POLY A DANS LA TRADUCTION IN VITRO DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4

L'activité a été mesurée par l'incorporation de ^{14}C valine dans les produits TCA insolubles à chaud au cours de la synthèse protéique dirigée par le mRNA tardif du phage T4 effectuée selon les conditions décrites par Salser et Coll. (359). Le poly A a été ajouté dès le temps zéro de l'incubation à des concentrations finales variant de 5 à 200 µg/ml.

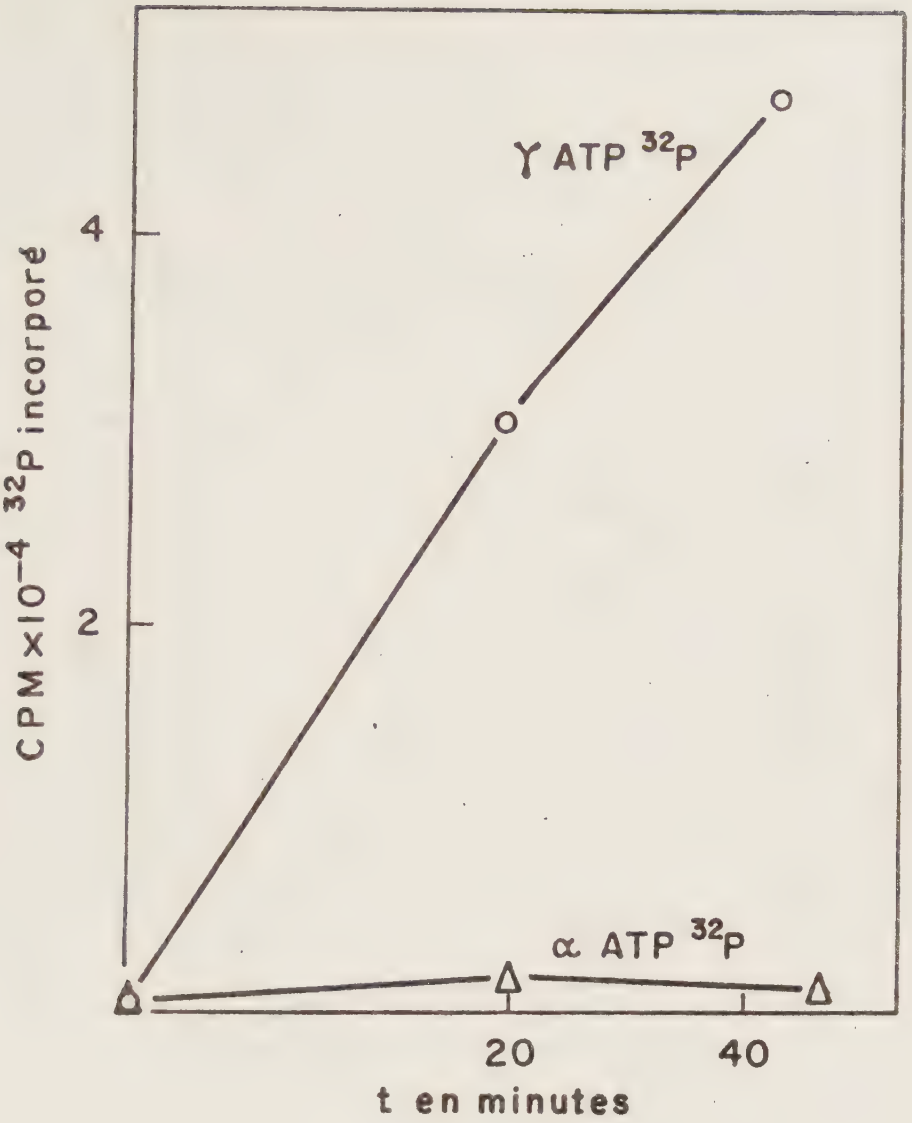


Figure 41 : INCORPORATION DE ^{32}P DANS UN PRODUIT TCA INSOLUBLE AU COURS DE L'INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION EN PRESENCE D'ATP-γ-^{32}P

Un extrait brut de facteurs d'initiation a été incubé à 37° C en présence d'un mélange ATP, PEP, PK selon les conditions décrites dans le tableau XXII. Deux incubations de 175 µl chacune, effectuées en parallèle, ont été réalisées, l'une en présence d'ATP-γ-^{32}P (24 µCi/ml; radioactivité spécifique finale 14 mCi/mM), l'autre en présence d'ATP-α-^{32}P (26 µCi/ml; radioactivité spécifique finale 14.5 mCi/mM). La concentration finale en extrait brut de facteurs d'initiation est de 3 mg/ml. Des fractions aliquotes de 40 1 prélevées à différents temps d'incubation ont été précipitées dans le TCA 5 % à 4° C. Le graphique montre la radioactivité incorporée dans les produits TCA insolubles à froid au cours de l'incubation effectuée en présence d'ATP-γ-^{32}P (O——O) et d'ATP-α-^{32}P (Δ—— Δ).

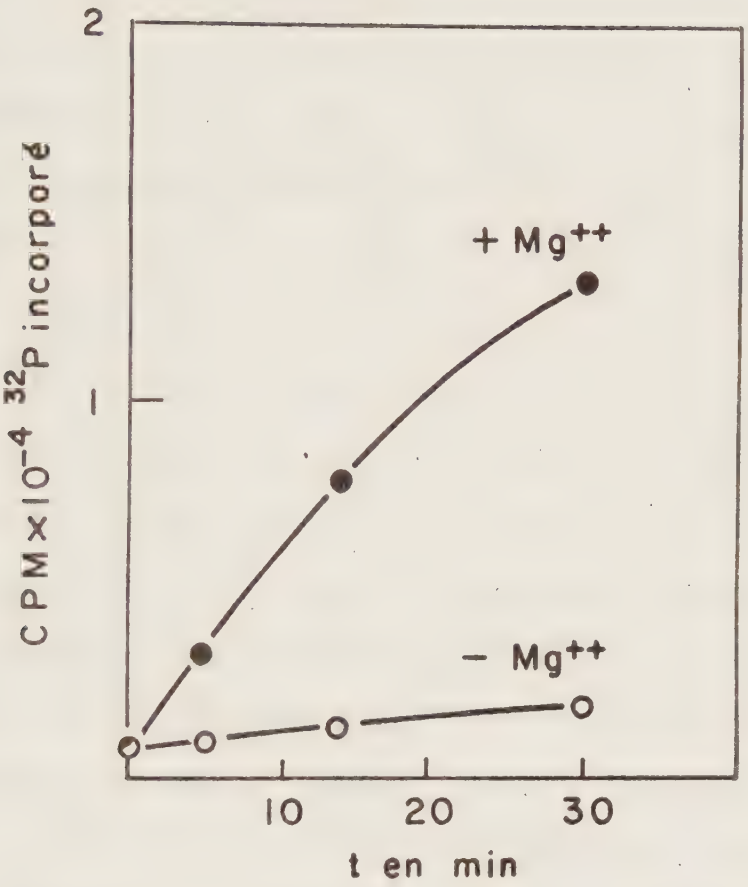


Figure 42 : INFLUENCE DU MAGNESIUM SUR L'INCORPORATION DE ^{32}P DANS UN PRODUIT TCA INSOLUBLE AU COURS DE L'INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEUR D'INITIATION EN PRESENCE D'ATP-γ-^{32}P

L'incubation d'un extrait brut de facteurs d'initiation et d'ATP-γ-^{32}P (12 µCi/ml; radioactivité spécifique 7 mCi/mM) a été réalisée dans les conditions décrites à la figure 41 en présence d'acétate de magnésium 10 mM (●———●) ou en absence de magnésium (O———O). La radioactivité TCA insoluble à froid a été mesurée en fonction du temps d'incubation.

Par ailleurs, la figure 43 montre que la formation du produit marqué est inhibée par la présence des sous-unités ribosomiques notamment, la particule 30 S. De plus, la capacité d'un extrait brut de facteurs d'initiation à incorporer l'ATP $\gamma\,^{32}P$ décroît parallèlement à la perte d'activité de ces facteurs dans la traduction (figure 44). L'addition de molécules d'IF 3 purifiées restaure l'activité de l'extrait préincubé dans la synthèse protéique, mais ne stimule pas l'incorporation de ^{32}P (figure 44).

Tout se passe comme si la baisse de capacité d'un extrait brut de facteurs d'initiation à former le produit marqué était liée à la perte d'activité dans la traduction d'un extrait brut de facteurs d'initiation incubé à 37° C. Le fait que l'addition de molécules purifiées du facteur IF 3 ne restaure pas l'"incorporation" de ^{32}P à partir de l'ATP $\gamma\,^{32}P$, pourrait laisser penser que tout comme l'inactivation in vitro du facteur IF 3 que nous avons décrite, cette "incorporation" est dépendante de l'existence d'un complexe présent dans l'extrait brut de facteur d'initiation. Cependant, une telle proposition demeure aujourd'hui très spéculative.

Nous avons alors mesuré l'activité de plusieurs sous-fractions, produits intermédiaires des différentes étapes de purification des facteurs d'initiation. Cette étude n'a donné aucun résultat à l'exception d'une préparation, le facteur i (protéine S 1) non complètement purifiée, provenant du laboratoire de Michel Revel (voir les conditions de préparation du facteur i dans la légende de la figure 45). Cette fraction présente une activité spécifique près de 100 fois

Figure 43 : EFFET DES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES SUR L'INCORPORATION DE ^{32}P DANS UN PRODUIT TCA INSOLUBLE FORME AU COURS DE L'INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION ET D'ATP-γ-^{32}P

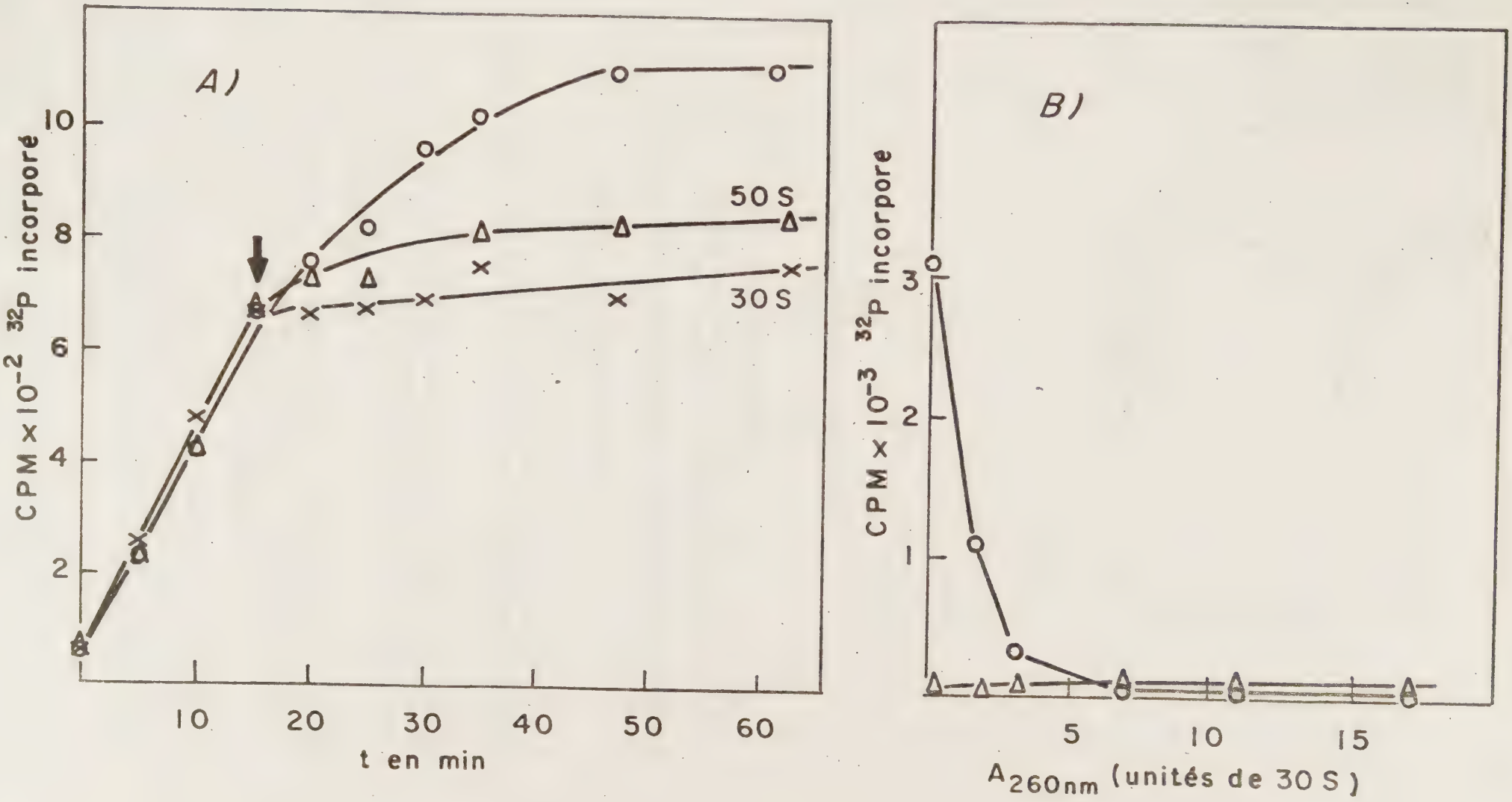
Les conditions générales d'incubation sont celles décrites dans le tableau XXII. Chaque incubation contient dans 175 µl de milieu, 600 µg d'un extrait brut de facteurs d'initiation.

Au cours de l'expérience dont les résultats sont portés sur le graphique A, on a ajouté après 15 minutes d'incubation 16.5 unités A260 nm de sous-unités 50 S ou 10.5 unités A260 nm de sous-unités 30 S. Les sous-unités ont été traitées par le tampon III (Tris HCl 10 mM pH 7.5; NH_4Cl, 1 M; Acétate de magnésium, 10 mM; β-mercaptoethanol 7 mM). Les sous-unités 30 S ont été resuspendues dans le tampon Tris HCl 50mM pH 7.5; NH_4Cl 200 mM; Acétate de magnésium 20 mM; Dithiothreitol 1 mM. Les sous-unités 50 S ont été resuspendues dans le tampon Tris HCl pH 7.5, 10 mM; NH_4Cl 100 mM; Acétate de magnésium 10 mM; Dithiothreitol 1 mM. Avant utilisation, ces sous-unités ont été diluées au 1/5ème, dans le tampon Tris HCl 10 mM, pH 7.5; β-mercaptoethanol 7 mM; après réactivation à 40° C. Des fractions aliquotes de 15 µl prélevées au cours de l'incubation ont été précipitées en présence d'entraîneur (sérum albumine) dans du TCA 5 % à froid.

Dans le graphique B, on rapporte les résultats d'expériences dans lesquelles on a ajouté, dès le temps zéro de l'incubation, des quantités variables de sous-unités 30 S (jusqu'à 17.5 unités A260 nm dans 175 µl d'incubation). Des prélèvements de 40 µl après 30 minutes d'incubation ont permis de déterminer la radioactivité ^{32}P TCA insoluble.

Au cours de ces différentes incubations, nous avons utilisé l'ATP-γ-^{32}P à une radioactivité spécifique finale de 1.25 mCi/mM (2 µ Ci/ml d'incubation).

Graphique A : Produit marqué au ^{32}P TCA insoluble à froid au cours d'une incubation en présence d'un extrait brut de facteurs d'initiation (O———O) auquel on a ajouté après 15 minutes d'incubation des sous unités 30 S (X———X) ou 50 S (Δ———Δ). Graphique B : formation du produit marqué après 30 min. d'incubation de quantités variables de sous-unités 30 S en présence (O———O) ou en absence (Δ———Δ) d'un extrait brut de facteurs d'initiation.


A)
B)
50 S
30 S
CPM x 10⁻² ³²P incorporé
CPM x 10⁻³ ³²P incorporé
t en min
A 260nm (unités de 30 S)

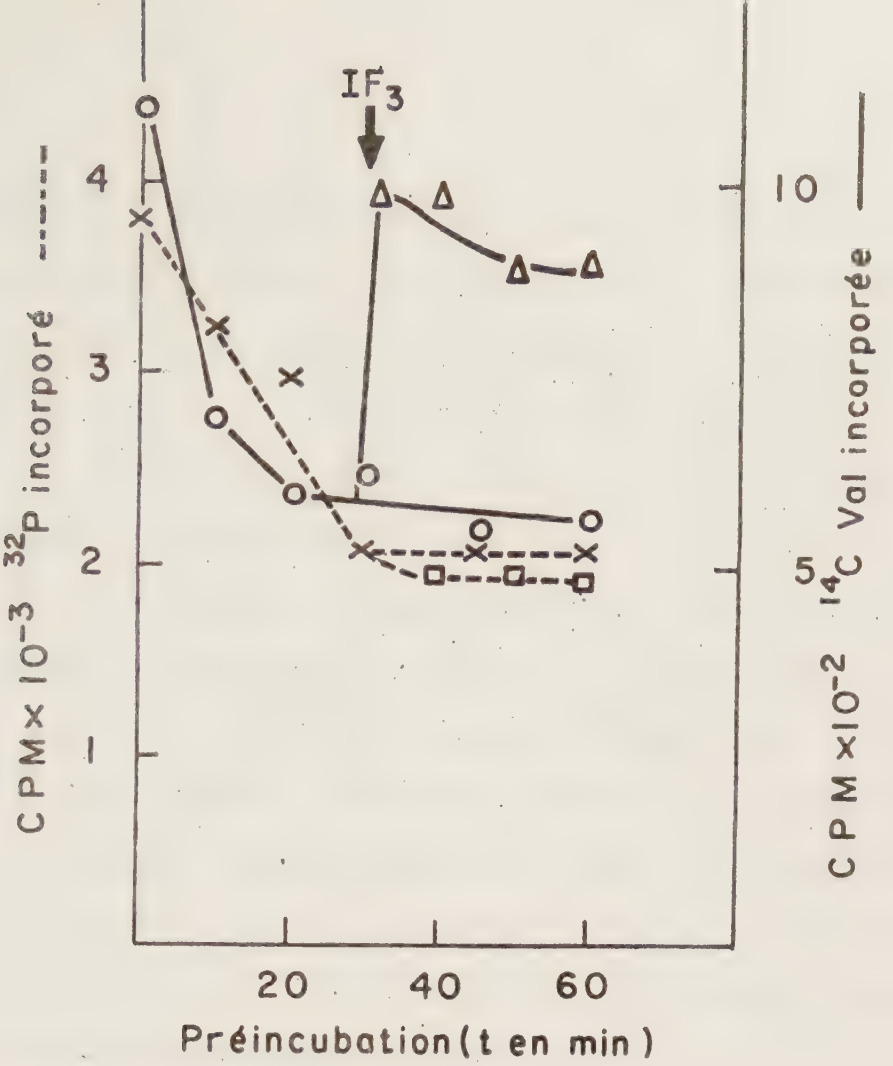


Figure 44 : CAPACITE D'INCORPORATION DU ^{32}P A PARTIR DE L'ATP-γ-^{32}P ET DE TRADUCTION DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4 PAR UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION INCUBE A 37° C

Un extrait brut de facteur d'initiation a été incubé à 37° C sans addition d'ATP, PEP, PK selon les conditions décrites dans le tableau XX.

Au cours de l'incubation, des fractions aliquotes ont été prélevées et testées dans leur capacité à synthétiser un produit TCA insoluble à froid marqué au ^{32}P en présence d'ATP-γ-^{32}P ou dans leur capacité de traduction des mRNA tardifs du phage T4.

Après 30 minutes d'incubation de l'extrait brut de facteurs d'initiation, on a prélevé une partie de celle-ci à laquelle on a ajouté du facteur IF 3 purifié. Les incubations ont été poursuivies et des fractions de ces incubats ont été testées comme précédemment.

L'ATP-γ-^{32}P a été utilisé dans les conditions décrites à la figure 43. Les incubations en présence de ce produit marqué ont été effectuées pendant 20 min. L'activité dans la traduction a été mesurée selon les conditions décrites par Salser et coll. (359) en utilisant des quantités limitantes de facteur d'initiation.

Le graphique montre l'activité de l'extrait brut de facteurs d'initiation dans la traduction des mRNA tardifs du phage T4 sans addition du facteur IF 3 (O——O), après addition du facteur IF 3 (Δ——Δ) et l'activité de ce même extrait dans la formation du produit ^{32}P TCA insoluble à froid sans addition (X-----X), ou après addition (□----□) du facteur IF 3 purifié.

supérieure à celle d'un extrait brut de facteurs d'initiation (tableau XXIV). De plus, sa capacité à incorporer l'ATP $\gamma^{32}P$ est inhibée par l'addition de facteurs IF 3 purifiés (figure 45A), mais stimulée par celle du mRNA tardif du phage T4 (figure 45C et tableau XXIV). L'addition du facteur IF 3, après 20 minutes d'incorporation, entraine une perte de la radioactivité TCA insoluble (figure 45B). Les résultats préliminaires semblaient indiquer que le facteur i (protéine S 1) pouvait participer à la synthèse du produit marqué par l'ATP $\gamma^{32}P$ au cours d'une réaction qui était inhibée par le facteur IF 3. Malheureusement, nous n'avons pu, jusqu'ici, reproduire ces résultats avec des lots différents de S 1 obtenus par le même laboratoire, dans des conditions rigoureusement identiques à celles utilisées pour la préparation du produit actif que nous avions testé. La protéine S 1 complètement purifiée ne présente pas cette réaction même en présence de différentes fractions provenant des étapes de purification des facteurs d'initiation. De plus, elle ne stimule pas l'activité d'incorporation des préparations d'extraits bruts de ces facteurs. Dès lors, nous avons poursuivi nos expériences sur les préparations non purifiées de facteurs d'initiation. La figure 46 montre que dans ces conditions l'incorporation d'ATP $\gamma^{32}P$ est inhibée par l'addition de la protéine S 1 purifiée et du facteur IF 3, alors que les protéines IF 1 et IF 2 sont sans effet.

La disparition du produit marqué par addition au cours de l'incorporation de facteurs IF 3 pouvait résulter soit d'un arrêt de la synthèse de ce produit soumis à un renouvellement rapide, soit de l'induction directe de sa dégradation. L'addition d'un excès d'ATP non marqué, après 15 minutes

TABLEAU XXIV

ACTIVITE COMPAREE DU FACTEUR IF 3, D'UNE PREPARATION DE LA PROTEINE i ET D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEUR D'INITIATION DANS L'INCORPORATION DE ^{32}P A PARTIR D'ATP-γ-^{32}P

	CPM ^{32}P incorporé	CPM/µg de protéine
i 7 µg	17.450	2.492
i 14 µg	37.929	2.708
IF 3 2.5 µg	30	12
IF 3 5 µg	35	7
IF Brut 60 µg	1.714	29
IF brut 120 µg	3.620	30
i (14 µg) + mRNA T4	45.783	3.270
i (14 µg) + mRNA T4 + IF 3 (4 µg)	34.155	2.439

Les conditions d'incorporation de ^{32}P dans les produits TCA insolubles à froid et les produits utilisés sont ceux décrits dans la figure 45.

Figure 45 : INFLUENCE DU FACTEUR IF 3 ET DES mRNA TARDIFS DU PHAGE T4 SUR L'INCORPORATION DE ^{32}P DANS UN PRODUIT TCA INSOLUBLE AU COURS D'UNE INCUBATION D'UNE FRACTION PURIFIEE DE FACTEUR i EN PRESENCE D'ATP-γ-^{32}P

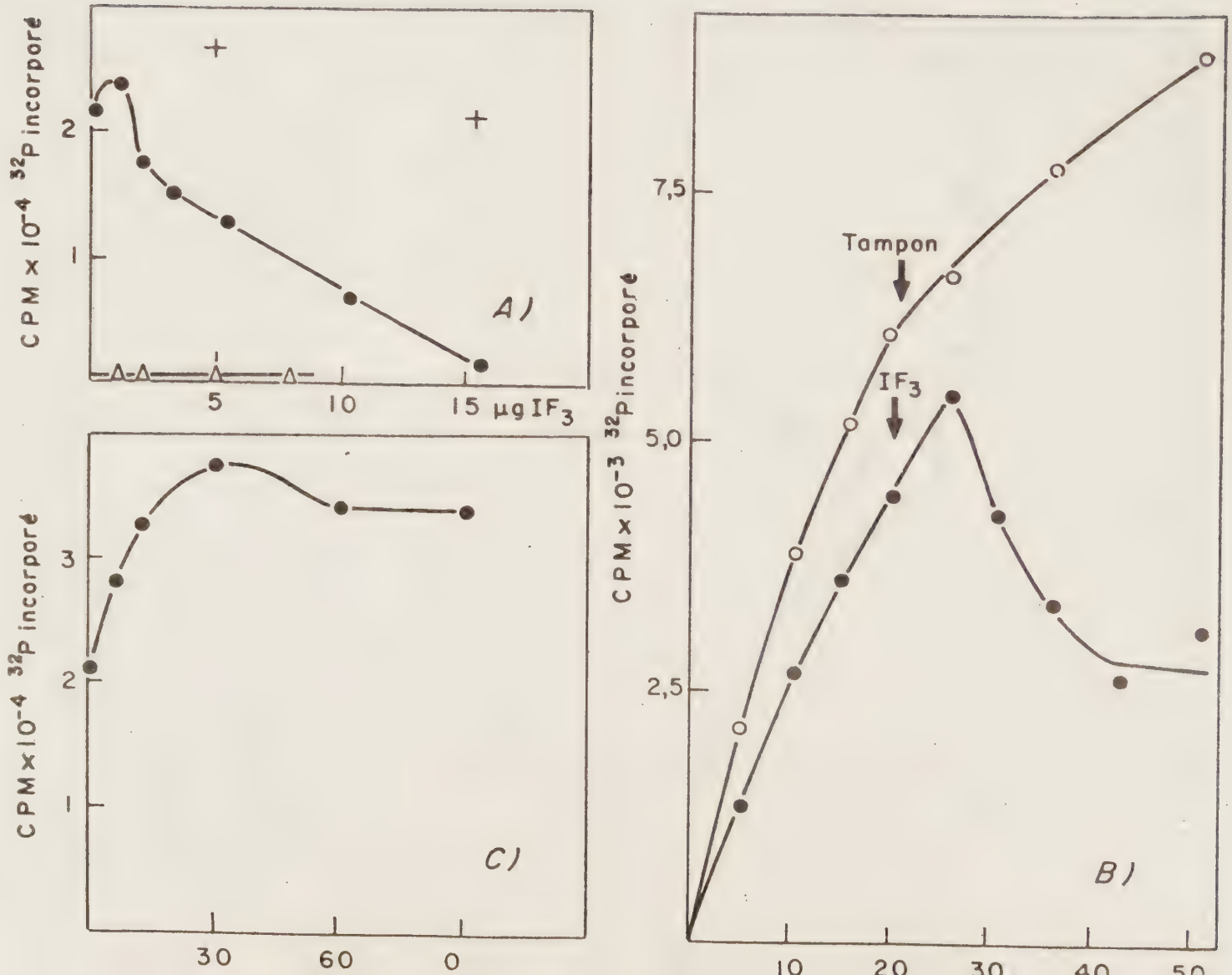
La détermination de l'incorporation de ^{32}P à partir de l'ATP-γ-^{32}P a été effective dans les conditions décrites dans la figure 41.

L'incubation a été effectuée sans extrait brut de facteurs d'initiation, en présence d'une préparation de facteur i isolée dans le laboratoire de M. Revel. Le facteur i a été purifié selon la technique décrite par Revel et coll. (233) sans que la dernière étape de purification n'ait été effectuée. En effet, cette préparation de facteur i n'a pas été purifiée sur gradient de glycérol 5-20 %.

Le graphique A indique l'incorporation de ^{32}P en présence de 14 µg de la préparation de facteur i et des quantités variables de facteur IF3 ajoutées au temps zéro de l'incubation (●——●), ou en absence de facteur i (Δ——Δ). Les croix indiquent l'incorporation en présence de facteur i et de volumes variables de tampon dans lequel est dilué le facteur IF3.

Le graphique B montre l'effet de l'addition, après 20 min. d'incubation, de facteur IF 3 (5 µg) purifié sur la cinétique d'incorporation de ^{32}P observée en présence de 14 µg de facteur i.

Le graphique C indique l'incorporation en présence de 14 µg de facteur i et de quantités variables de mRNA tardifs du phage T4.


CPM × 10⁻⁴ ³²P incorporé
2
1
A)
5
10
15 µg IF₃
CPM×10⁻⁴ ³²P incorporé
3
2
1
C)
30
60
0
CPM×10⁻³ ³²P incorporé
7,5
5,0
2,5
Tampon
IF₃
B)
10
20
30
40
50

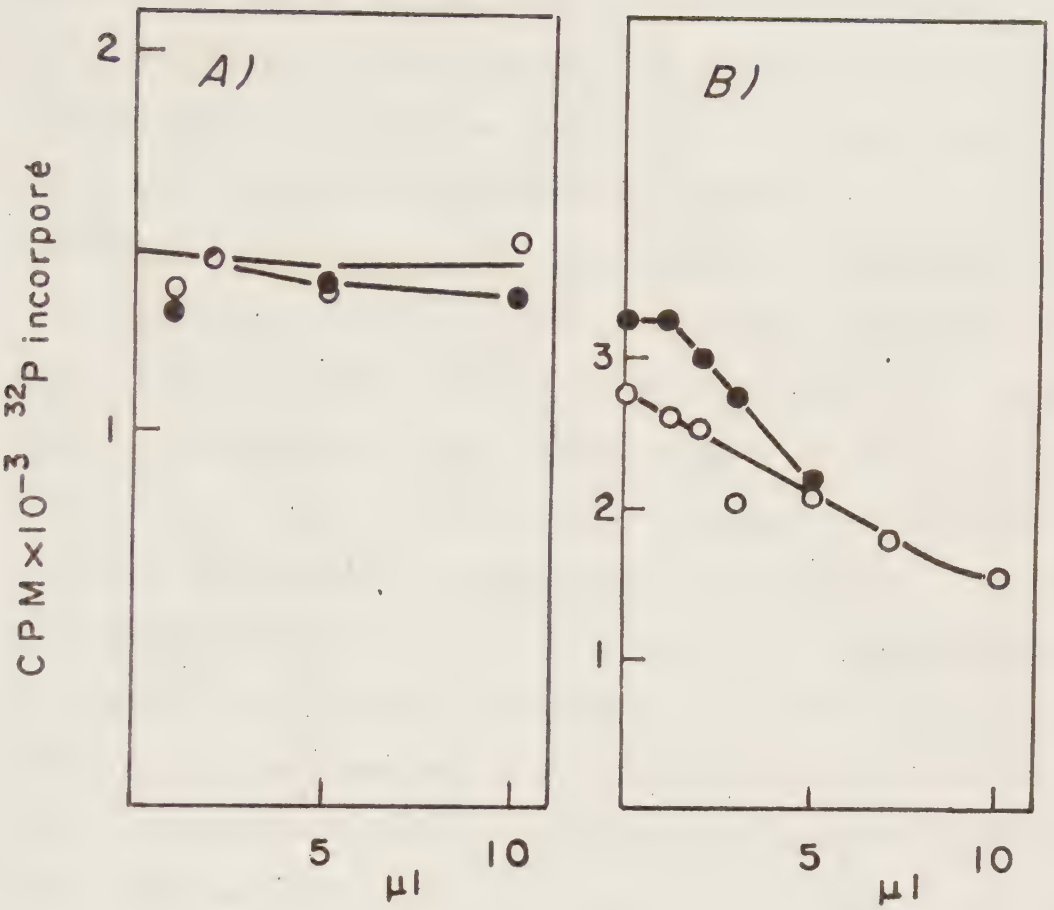


Figure 46 : EFFETS DES FACTEURS D'INITIATION ET DE LA PROTEINE S 1 SUR L'INCORPORATION DE ^{32}P DANS UN PRODUIT TCA INSOLUBLE AU COURS D'UNE INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION.

L'incubation de chaque essai a été réalisé dans les milieux réactionnels décrits dans le tableau XXII en présence d'ATP-γ-^{32}P. Pour 90 µl de milieu réactionnel, on a utilisé 180 µg (expérience A) et 360 µg (expérience B) d'un extrait brut de facteurs d'initiation auxquels on a ajouté des quantités variables de facteur IF 1 (0.8 µg/µ l), IF 2 (0.6 µg/µl), IF 3 (1 µg/µl) ou de protéine S 1 complètement purifiée (1.7 µg/µl). Le graphique A montre l'incorporation de ^{32}P dans les produits TCA insolubles à froid en présence du facteur IF 1 (●——●) ou IF 2 (O——O); le graphique B montre une incorporation analogue en présence de la protéine S 1 (●——●) ou du facteur IF 3 (O——O).

d'incorporation par l'extrait brut de facteurs d'initiation n'entraîne pas la disparition du composé radioactif (figure 47). Ce dernier n'est donc pas le siège d'un renouvellement rapide, du moins dans ces conditions d'incorporation. Si on admet que la réaction observée en présence du lot de facteur i préparé par Michel Revel, est analogue à celle qui permet l'incorporation d'ATP $\gamma^{32}P$ dans un extrait brut de facteur d'initiation, on peut conclure que le facteur IF 3 exogène induit la dégradation du produit marqué, mais une telle analogie n'a pu être vérifiée; nous ne disposions pas d'une quantité suffisante de préparation de facteur i. De plus, l'addition du facteur IF 3 au cours d'une incorporation par un extrait brut arrête la formation du produit marqué sans que l'on puisse observer une dégradation de celui-ci. Le fait que l'extrait brut soit un mélange de plusieurs composés ne peut nous permettre d'exclure que la stabilité accrue du produit formé ne soit pas dûe à une protection de celui-ci qui ne peut se manifester dans les fractions plus purifiées.

Si l'étude de cette réaction reste donc très préliminaire et ne nous autorise pas d'affirmer qu'elle est impliquée dans l'inactivation du facteur IF 3, il nous est, néanmoins, possible de préciser la nature du produit radioactif formé au cours de l'incorporation d'ATP $\gamma^{32}P$. L'addition de ribonucléase pancréatique (40 µg/ml) ou de désoxyribonucléase (20 µg/ml), après 20 minutes d'incorporation d'ATP $\gamma^{32}P$, n'entraine pas une dégradation du composé radioactif. La présence de ces enzymes nucléolytiques, dès le temps zéro de l'incubation, ne modifie pas la cinétique d'incorporation du ^{32}P dans le produit

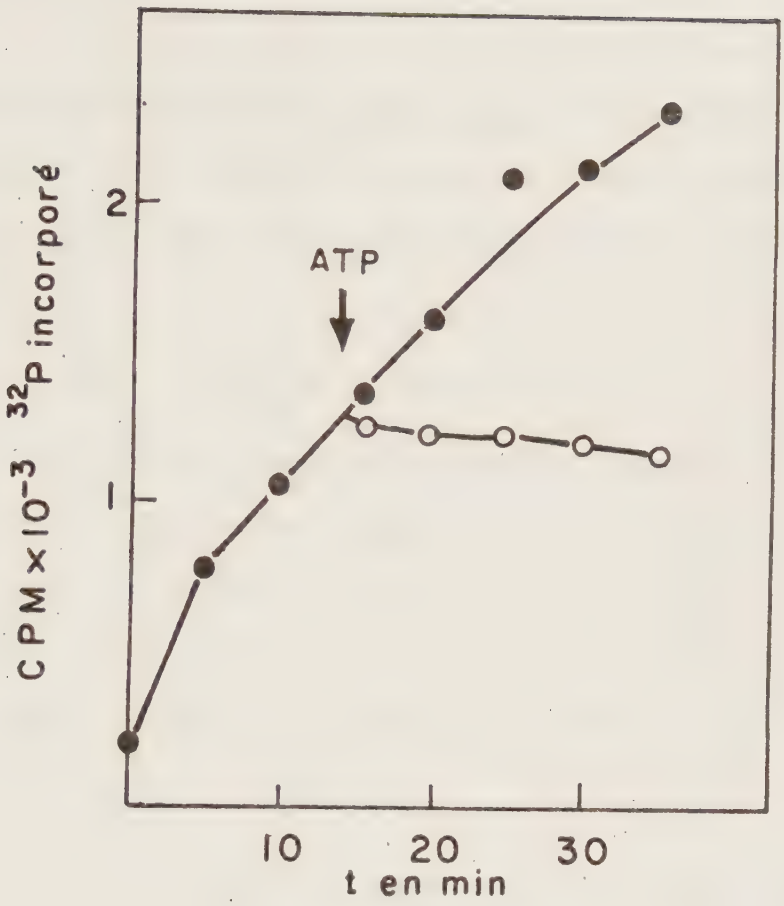


Figure 47 : EFFET DE L'ADDITION D'ATP NON MARQUE AU COURS DE L'INCORPORATION DE ^{32}P PAR UN EXTRAIT BRUT DE FACTEUR D'INITIATION

A un milieu réactionnel de 100 µl contenant de l'ATP-γ -^{32}P et un extrait brut de facteur d'initiation dans des conditions analogues à celles décrites dans la figure 41, on a ajouté, après 15 min. d'incubation de l'ATP non marqué (concentration finale 16 mM). On a mesuré la radioactivité sur des fractions aliquotes prélevées au cours de l'incubation et précipitées par le TCA 5 % à 4° C. Incubation sans addition (●——●) et avec addition (O——O) d'ATP non marqué en excès.

TCA insoluble. De plus, le composé marqué est TCA insoluble à froid, mais TCA soluble à chaud.

Kornberg et coll. (308,309) ont mis en évidence, dans les extraits d'Escherichia coli une activité enzymatique responsable de la synthèse de polymères métaphosphates, à partir de l'ATP, qui présente une très grande analogie avec notre réaction.

Cette activité enzymatique :

1 - est strictement dépendante de la présence d'ions magnésium;
2 - nécessite un système régulateur d'énergie, l'accumulation d'ADP provoque une inhibition de la réaction;
3 - permet la synthèse d'un produit radioactif seulement à partir d'ATP $\gamma\,^{32}P$, mais pas d'ATP $\beta\,^{32}P$.

Le produit synthétisé :

1 - forme avec les protéines un complexe acido insoluble à froid et acido soluble à chaud;
2 - n'est pas dégradé par la ribonucléase ou la désoxyribonucléase;
3 - est formé en présence des enzymes nucléolytiques.

5 - Stabilité de l'activité du facteur IF 3 et cycle ribosomique.

L'arrêt de la synthèse protéique après addition du chloramphénicol diminue donc la capacité de la cellule à assurer la formation du complexe d'initiation de la traduction. Cette modification est due à une perte d'activité du facteur IF 3 et à un degré moindre du facteur IF 2, qui n'est pas retrouvée dans les surnageants S 150 des extraits de bactéries traitées par la drogue.

Ces résultats qui corroborent ceux obtenus par Young et Nakada (294,295) peuvent être rapprochés des études relatives à la stabilité de l'activité des facteurs d'initiation chez des bactéries maintenues en phase stationnaire. Scheps et Revel (303) ont montré que dans ces conditions, on observait une perte de l'activité du facteur IF 3 dans la formation du complexe d'initiation. De plus, on sait que le facteur IF 3 induit la dissociation des monosomes en sous-unités ribosomiques (310-314,304) grâce à l'activité anti-associante qu'il possède (315-317). Des préparations non purifiées de facteurs d'initiation extraits de bactéries traitées par le chloramphénicol (295), ou maintenues en phase stationnaire (318,319) présentent un taux de dissociation de monosomes inférieur à celui des facteurs d'initiation obtenus à partir de cellules en croissance exponentielle.

Young et Nakada (295) avaient proposé que la perte des activités du facteur IF 3 était la conséquence de l'arrêt de la synthèse protéique quelle que soit le mode d'inhibition de la traduction. Nos résultats infirment cette proposition. Les facteurs d'initiation des bactéries de la souche PA 1 ou PA 2 carencées en arginine, ou de la souche AS 19 traitées par la puromycine, ont une capacité à former <u>in vitro</u> les complexes d'initiation analogue à celle des facteurs extraits de cellules en croissance exponentielle. Des résultats analogues ont été obtenus par Lavallé (324) au cours de l'étude de la stabilité de l'activité des facteurs d'initiation des bactéries de la souche PA 1 et PA 2 carencées en arginine. Cette variation de stabilité du facteur IF 3 <u>in vivo</u>, selon la nature des condi-

tions imposant une inhibition de la traduction, peut être corrélée avec la participation de ce facteur dans le fonctionnement du cycle ribosomique. On sait, en effet, que le facteur IF 3 se détache du complexe d'initiation au cours de la formation de celui-ci (304,305). Si le facteur ne peut s'associer avec une sous-unité native 30 S selon la proposition de Kaempfer (320), il est alors susceptible d'être inactivé. Un tel modèle lie la stabilité de l'activité du facteur IF 3 avec la capacité de la cellule à maintenir un taux d'échange minimum entre les sous-unités natives et les complexes ribosomes-mRNA.

On sait que l'addition du chloramphénicol bloque les ribosomes en cours de traduction sur lesquels les peptidyl-tRNA perdent leur réactivité à la puromycine (298). De plus, dans ces conditions les sous-unités natives présentes au moment de l'addition de l'antibiotique sont rapidement converties en monosomes inactifs (321,322). Enfin, Kaempfer (1) a montré que le chloramphénicol inhibait in vitro à plus de 80 % le taux d'échange entre les sous-unités libres et les ribosomes associés au mRNA.

La puromycine a une action très différente sur le fonctionnement de cette étape du cycle ribosomique. Son addition entraine le détachement des peptidyl-tRNA des polysomes, et accroit in vitro le taux d'échange entre les sous-unités libres et les complexes ribosomes-mRNA (296). De plus, Schlessinger et coll. (323) ont montré que l'addition de cet antibiotique entrainait un accroissement du nombre de sous-unités libres dans la cellule.

Au cours d'une carence en arginine, les bactéries des souches PA 1 et PA 2 ont un niveau de polysome identique

à celui que présentent des cellules en croissance exponentielle (325). De plus, il a été montré que les polysomes des bactéries carencées en acide aminé présentent un renouvellement rapide (326). Bien que ce renouvellement n'intéresse qu'une fraction de la population ribosomique, leur échange avec les sous-unités natives s'effectue avec un taux comparable à celui des bactéries non carencées (327).

En maintenant l'activité de leur cycle ribosomique, les cellules traitées par la puromycine, ou les bactéries des souches PA 1 et PA 2 carencées en arginine assureraient la stabilité de l'activité du facteur IF 3. A l'inverse l'accumulation dans les cellules des monosomes inactifs provoquée par l'addition du chloramphénicol ou le maintien des bactéries en phase stationnaire (321) inhiberait le fonctionnement du cycle ribosomique et induirait une perte de l'activité de IF 3.

Les informations relatives au mode d'inactivation du facteur IF 3 demeurent fragmentaires. Néanmoins, on peut proposer que ce phénomène résulterait en fait, de mécanismes différents. Au cours de l'infection abortive des cellules de souches F^- d'Escherichia coli par le bactériophage T7, on observe une dégradation rapide du facteur IF 3 induite par une activité protéolytique qui est inhibée par le PMSF (233). Un tel mécanisme ne se produit pas au cours de l'infection de souches bactériennes F^- par le même phage. On sait aussi que la quantité de facteurs IF 3 n'est pas modifiée au cours d'une infection par le phage T4 (233). La perte de l'activité du facteur IF 3 chez des cellules maintenues en phase stationnaire

ne peut que partiellement être attribuée à une dégradation de la molécule (233,303). On sait que dans ces conditions de culture apparaissent des activités proteolytiques sensibles au PMSF (328). De telles activités n'existent vraisemblablement pas chez des bactéries traitées par le chloramphénicol, l'addition de cet antibiotique est suivie d'une inhibition de la dégradation des protéines (329-332). Nos résultats relatifs au dosage des motifs antigéniques de la protéine de IF 3 montrent que la perte d'activité du facteur observée au cours d'une incubation in vitro d'une préparation non purifiée, ne peut être attribuée à une dégradation complète de la molécule. Néanmoins, ceci ne saurait exclure définitivement l'intervention d'une protéolyse ménagée qui provoquerait un nombre réduit de coupures de la protéine. On sait, en effet, que de tels extraits bruts de facteurs d'initiation sont riches en protéases, mais que celles-ci sont peu sensibles à l'action du PMSF (332). Ces enzymes protéolytiques correspondent, selon la proposition de Goldberg (328), aux activités présentes dans les cellules en croissance exponentielle qui se distinguent des protéases accumulées par les cellules en phase stationnaire par leur faible sensibilité au PMSF (328). L'inhibition de telles activités protéolytiques nécessite le chauffage à 50° C, en présence d'EDTA (332), procédé auquel nous ne pouvons avoir recours dès lors qu'il nous faut mesurer l'activité des facteurs d'initiation.

Nos résultats indiquent que l'inactivation in vitro du facteur IF 3 se produit au cours d'une incubation à 37° C sur des molécules présentes dans une préparation non purifiée (extraits bruts ou fraction AS 2) et participant à un complexe

préformé dans la cellule. Kaempfer (315) a montré que l'activité dissociante d'un extrait brut de facteur d'initiation d'Escherichia coli est thermosensible dans des conditions où la protéine IF 3 purifiée est thermostable. Cette thermosensibilité est maintenue dans la fraction AS 2 (315). Un tel phénomène a été observé aussi chez des bactéries thermophiles : Bacillus stéarothermophilus (318). De plus, il a été montré que le passage de 30° C à 44° C d'une culture d'Escherichia coli entraine un arrêt de la synthèse protéique qui se trouve affectée dans l'initiation (333). Une telle inhibition peut être provoquée in vitro par chauffage dans les mêmes conditions de l'extrait brut de facteurs d'initiation (333). Enfin, récemment, ont été isolés des mutants thermosensibles qui sont affectés dans la traduction. Cette inhibition par chauffage peut être reversée in vitro par l'addition de facteur IF 3, alors que les facteurs IF 1 et IF 2 ne restaurent pas l'activité de la synthèse protéique (334). Au cours de notre travail, nous avons observé qu'un extrait brut de facteurs d'initiation permettait l'incorporation de ^{32}P à partir d'ATP $\gamma\,^{32}P$ dans un produit aux propriétés analogues à celles d'un polyphosphate. La relation entre cette activité et l'inhibition du facteur IF3 reste à démontrer. On sait que l'accumulation de polyphosphates se produit dans la cellule dès lors que les conditions de culture sont défavorables (anaérobiose, par exemple)(308). Il serait, par ailleurs, intéressant d'examiner si ce phénomène peut être relié avec les observations relatives aux modifications de l'activité de la traduction induites par l'infection de certains bactériophages. On sait que l'infection par le phage T7 de souches F^- d'Escherichia coli provoque la formation de la protéine

I qui inhibe la RNA polymérase de la cellule hôte (263). Cette protéine, qui a un poids moléculaire de 66.000, inhibe aussi la traduction in vitro du RNA de MS 2. Cette inhibition est reversée par un excès du RNA messager dans des conditions qui rappellent l'activité de la protéine S 1 sur la traduction in vitro du RNA de R 17 (236,335). De plus, il a été montré que l'infection par le bactériophage T4 induit une modification chimique, non identifiée, de la protéine S 1 (233) et provoque une inhibition de la traduction du RNA de MS 2. Le fait que la protéine S 1 et le facteur IF 3 forment in vivo un complexe qui a pu être isolé par Groner et coll. (336), nous avait conduit à examiner si la protéine S 1 participait à l'induction de la thermosensibilité de IF 3. Nous avons observé que l'addition de molécules S 1 purifiées au milieu de préincubation d'un extrait brut de facteurs d'initiation ne modifiait pas le taux d'inactivation de IF 3.

Si la protéine S 1 participe au complexe responsable de la formation de polyphosphates comme certains résultats préliminaires semblaient l'indiquer, l'addition de l'Ig G dirigé contre cette protéine doit inhiber cette réaction. C'est ce qu'indique la figure 48. Cependant, si l'on substitue aux molécules d'Ig G les fragments Fab correspondants, l'inhibition n'est pas observée. Le fait que la protéine S 1 ait un poids moléculaire élevé (65.000) peut induire en présence des Ig G dirigés contre elle, la formation d'un réseau macromoléculaire produit par l'interaction de déterminants antigéniques différents de plusieurs molécules de S 1 avec une molécule d'Ig G. Un tel réseau pourrait enfermer d'autres protéines de faible poids moléculaire dont le facteur IF 3 (PM 21.000) qui serait

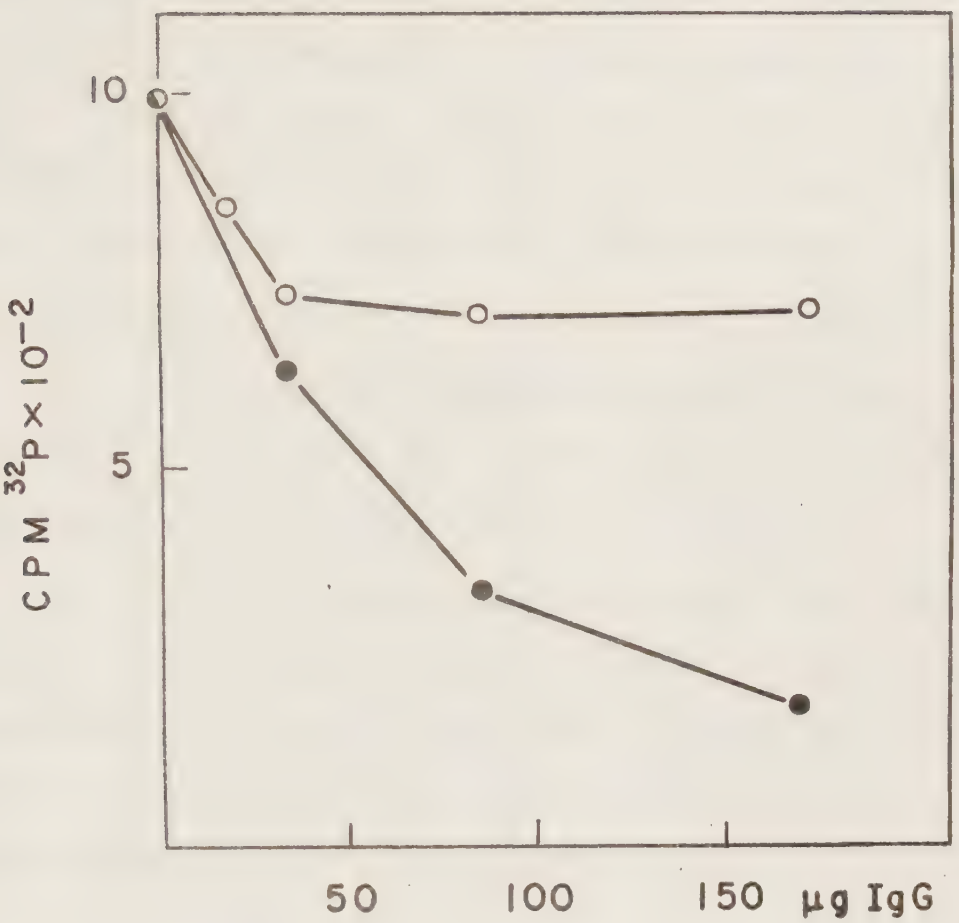


Figure 48 : EFFET DE L'Ig G DIRIGEE CONTRE LA PROTEINE S 1 SUR L'INCORPORATION DE ^{32}P AU COURS D'UNE INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION EN PRESENCE D'ATP-γ-^{32}P

Le milieu d'incubation contient dans 200 µl : 300 µg d'un extrait brut de facteurs d'initiation auquel on ajoute, dès la température zéro, des quantités variables d'Ig G dirigées contre la protéine S 1. L'incubation est effectuée pendant 15 min. à 37° C en présence de l'Ig G (●———●) ou d'un volume équivalent de tampon dans lequel l'anticorps est dissous (O———O). L'anticorps est dissous dans le tampon phosphate de potassium pH 8.0, 1 mM. Les conditions générales d'incubation sont celles décrites dans le figure 41.

alors inaccessible à la sous-unité 30 S. Le fait que la capacité d'un extrait de facteurs d'initiation à former le produit analogue aux polyphosphates, diminue au cours de l'incubation à 37° C, nous a conduit à étudier si la protéine S 1 était dégradée au cours de cette incubation. La figure 49 montre que la quantité de déterminants antigéniques de S 1 ne varie pas après une préincubation de 120 minutes à 37° C.

Tout modèle susceptible de rendre compte de cette réaction d'inhibition, ATP dépendante, de l'activité de la traduction reste donc très spéculatif.

Il est intéressant de noter que tout comme le facteur IF 3 ou le complexe responsable de la formation de polyphosphate un facteur impliqué dans la régulation de la traduction, le facteur stringent est thermosensible (337). Les ribosomes protègent ce produit du gène Rel A^+ de l'inactivation thermique (337).

B. - ACTION DU ppGpp SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE IN VITRO

Nous avons rappelé dans l'introduction à ce chapitre qu'une carence en acide aminé induisait chez des bactéries des souches sauvages d'*Escherichia coli* des modifications de différentes fonctions cellulaires, modifications commandées par le produit du gène Rel A. Le fait qu'une telle carence inhibe un processus aussi fondamental que celui de l'expression génétique justifie à lui seul l'effet pléiotropique de l'expression de ce gène (78). Il est difficile d'imaginer une action directe du produit du gène Rel A sur l'ensemble des mécanismes cellulai-

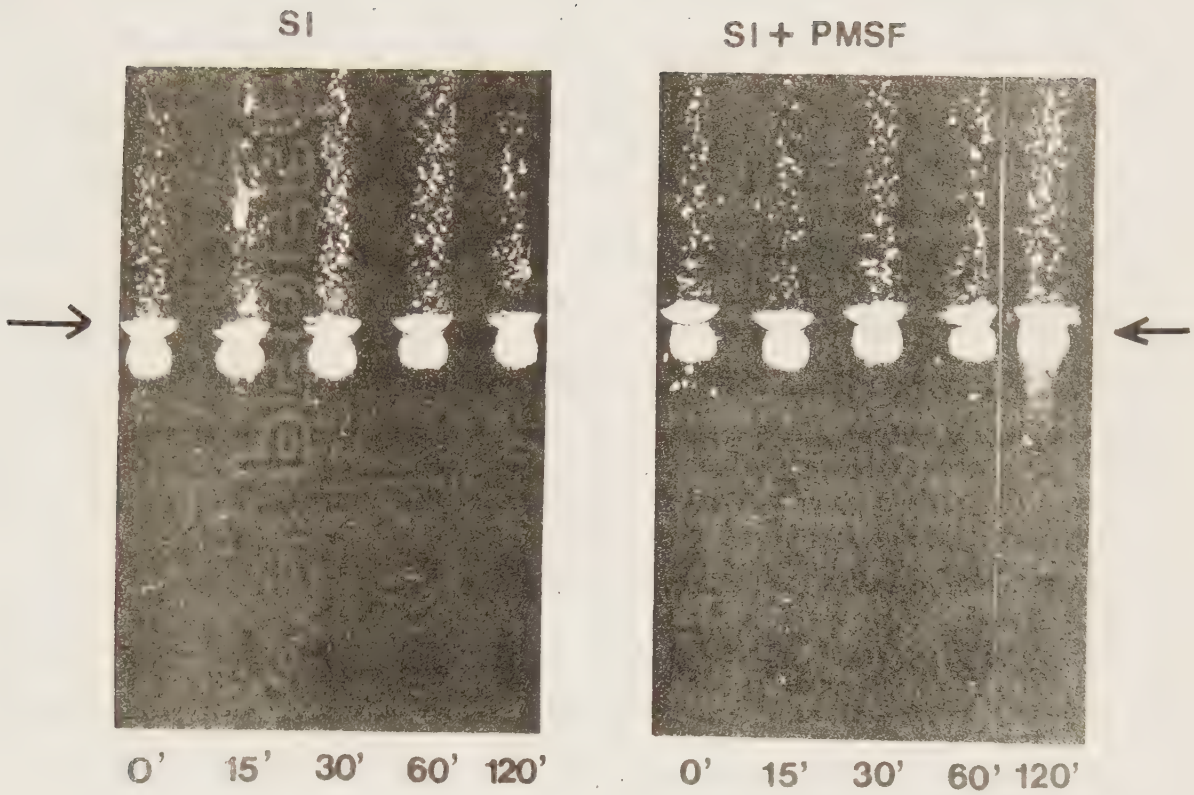


Figure 49 : DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTEINE S 1 AU COURS DE L'INCUBATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FACTEURS D'INITIATION A 37° C

Les conditions de ce dosage sont identiques à celles décrites dans la figure 36 à la substitution près du sérum dirigé contre le facteur IF 3 par le sérum dirigé contre la protéine S 1. L'incubation à 37° C a eu lieu en présence (photographie B), ou en absence (photographie A) de PMSF. La quantité d'anticorps est la même dans chaque tube.

res qu'il affecte. La découverte de l'accumulation en quantité importante (2×10^6 molécules par cellule)(338) de produits MSI et MSII (339) au cours de l'expression de ce gène chez des bactéries Rel A^+ privées d'un ou plusieurs acides aminés essentiels, permet de penser que ces molécules sont les effecteurs intermédiaires responsables du caractère pléiotropique de cette activité. Le produit MSI a été identifié comme étant un guanosine tétraphosphate, le ppGpp (340) dont la synthèse *in vitro* est principalement le résultat de l'interaction du produit du gène Rel A^+ (facteur stringent) avec un complexe ribosome-mRNA-tRNA déacylé (264). L'action *in vitro* du ppGpp sur les différents mécanismes modifiés *in vivo* par l'expression du gène Rel A^+ a été rapportée dans de nombreux articles (voir la revue de Cashel et Gallant (280).

La traduction implique la participation d'un grand nombre de fonctions cellulaires, on peut donc supposer que l'arrêt de la synthèse protéique provoquée par la carence en acide aminé modifie l'activité de certaines de ces fonctions. Ces modifications éventuelles pourraient résulter de l'action du ppGpp, il a été montré que le nucléoside tétraphosphate s'associe fortement au facteur d'élongation EF Tu ou avec les sous-unités III et IV de la Q_β replicase qui ont été identifiées comme étant les facteurs EF Tu et EF Ts de la cellule hôte respectivement (262).

Nous avons, au cours de ce travail, analysé l'effet du ppGpp sur différentes étapes de la synthèse protéique *in vitro*.

1. - Effet du ppGpp sur la synthèse protéique dirigée par les mRNA naturels ou le poly U.

Le ppGpp inhibe la traduction in vitro des mRNA naturels (tableau XXV) et du poly U (figure 50). Cette inhibition de la synthèse de polyphénylalanine est dépendante de la concentration en magnésium du milieu d'incubation. Elle est élevée pour des concentrations inférieures à 20 mM, mais très faibles pour des valeurs supérieures (figure 50). Dans ces dernières conditions, la fixation du Phe tRNA sur le ribosome est indépendante du facteur EF Tu, seules les activités du facteur EFG et de la peptidyl transférase participent à la synthèse de polyphénylalanine (341).

Nos résultats indiquent, par ailleurs, que le taux d'inhibition de la traduction des mRNA naturels par le nucléoside tétraphosphate est indépendant du message utilisé. Ce taux est, dans nos conditions expérimentales, de 65 à 70 % de l'activité du contrôle.

2. - Effet du ppGpp sur l'initiation de la traduction.

La formation du complexe d'initiation dirigée par le mRNA tardif du bactériophage T4 est inhibée à 62 % par le ppGpp (tableau XXVI). Cet effet n'est pas modifié pour des variations de la concentration du GTP comprises entre 10^{-7} et 2×10^{-3}M et dans l'intervalle de concentration en magnésium de 6 à 10 mM.

Cette réaction du nucléoside tétraphosphate est plus faible si on substitue au GTP son analogue, le GMP-PCP

TABLEAU XXV

EFFET DU ppGpp SUR LA TRADUCTION DE MESSAGERS NATURELS

mRNA	pmoles de valine incorporée		% inhibition
	sans ppGpp	ppGpp 1mM	
E. coli	16,8	4,8	68
R 17	49,0	15,0	69
T4 tardif (25 min.)	66,0	23,0	65

Les conditions de traduction des mRNA sont celles décrites par Salser et coll. (359).

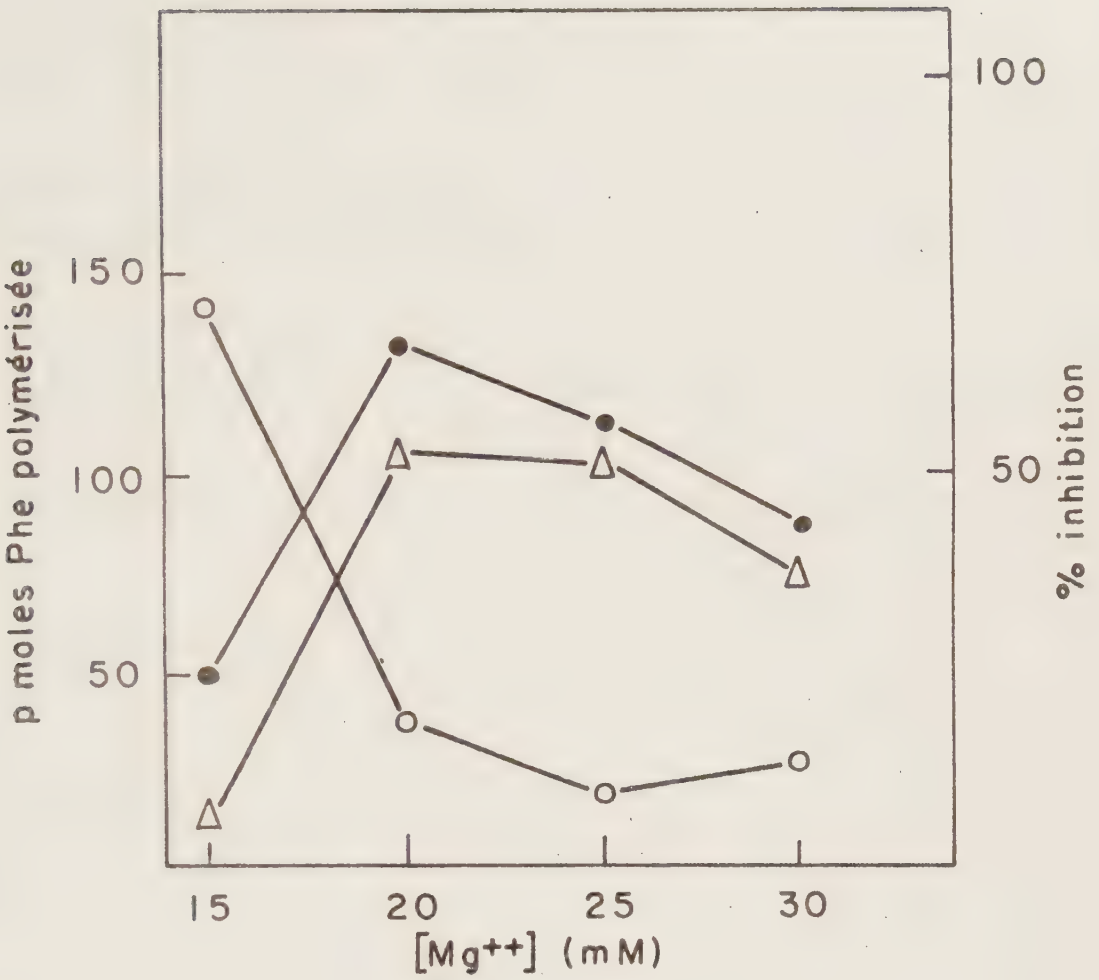


Figure 50 : INFLUENCE DU MAGNESIUM SUR L'EFFET DU ppGpp DANS LA SYNTHESE DE POLYPHENYLALANINE

La synthèse de polyphenylalanine a été réalisée selon les conditions décrites dans le tableau X. Cette synthèse a été effectuée en absence (●——●) ou en présence (Δ——Δ) de 10^{-3}M de ppGpp. Le taux d'inhibition par le ppGpp a été mesurée en fonction de la concentration en magnésium du milieu d'incubation (O——O).

TABLEAU XXVI

EFFET DU ppGpp SUR LA FIXATION DU f Met tRNA SUR LES RIBOSOMES, DIRIGEE PAR LE mRNA TARDIF DE T4 EN PRESENCE DE GTP OU DE GMP-PCP

Expériences	pmoles f Met tRNA fixé sur les ribosomes			% inhibition
	- T4 mRNA	+ T4 mRNA		
1.				
GTP	2.5	5.4	2.9	62
GTP + ppGpp	1.3	2.4	1.1	
2.				
GMP - PCP	1.5	2.4	0.9	33
GMP - PCP + ppGpp	0.5	1.1	0.6	

Les conditions générales d'incubation sont celles décrites dans le tableau XVII.

Quand nous l'indiquons, le GTP, le GMP - PCP et le ppGpp ont été additionnés à une concentration égale à 10^{-4}M, 7 x 10^{-4}M et 10^{-3}M respectivement.

L'incubation a été réalisée en présence de préparation brute de facteurs d'initiation extraits de cellules en croissance exponentielle.

qui ne peut être hydrolysé (342). Dans ces conditions, la fixation du fMet-tRNA est assurée avec une efficacité moindre qu'en présence de GTP, mais l'effet inhibiteur du ppGpp est réduit de moitié (tableau XXVI).

On sait que le facteur IF 2 est recyclé au cours de la fonction du complexe d'initiation. Son exclusion de ce complexe nécessite l'hydrolyse du GTP (343,344). Le fait que le taux d'inhibition de la fixation du tRNA initiateur par le ppGpp soit plus élevé en présence de GTP, nous a conduit à mesurer l'effet du nucléoside tétraphosphate sur l'hydrolyse du GTP dépendante du facteur IF 2.

Le tableau XXVII montre qu'en présence du facteur IF 1 (réaction couplée) ou en son absence (réaction non couplée), le ppGpp inhibe complètement l'hydrolyse du GTP. L'hydrolyse que nous avons mesurée est spécifique du facteur IF 2 et ne peut être attribuée à une activité du facteur EFG qui serait présent sur les ribosomes. En effet, la méthode utilisée pour préparer les ribosomes (345) permet l'élimination du facteur EFG de la particule comme l'indique le faible taux d'inhibition de l'activité GTPasique provoquée par l'addition de l'acide fusidique (tableau XXVII).

Il semble donc que le produit MSI inhibe l'initiation de la traduction en affectant le fonctionnement normal du facteur IF 2.

3. - Effet du ppGpp sur la fixation du Phe tRNA au site A du ribosome et sur l'activité du facteur EF Tu.

La préparation du facteur EF Tu utilisée est très purifiée et ne contient pas ou peu de facteurs EFG. La fixation

TABLEAU XXVII

EFFET DU ppGpp SUR L'ACTIVITE GTPase DU FACTEUR IF 2

Additions	pmoles Pi libéré	
	Total	Δ
Ribosomes	32.0	-
Ribosomes + acide fusidique	31.6	< 0
IF 1	1.6	-
IF 2	6.8	-
Ribosomes + IF 1	31.2	< 0
Ribosomes + IF 2	174.0	135.2
Ribosomes + IF 2 + acide fusidique	172.0	133.6
Ribosomes + IF 2 + ppGpp	38.0	< 0
Ribosomes + IF 1 + IF 2 + pAUG + fMet-tRNA	186.6	146.6
Ribosomes + IF 1 + IF 2 + pAUG + fMet-tRNA + acide fusidique	178.0	138.6
Ribosomes + IF 1 + IF 2 + pAUG + fMet-tRNA + ppGpp	28.4	< 0

Quand nous l'indiquons, l'acide fusidique et le ppGpp ont été additionnés à des concentrations égales à 100 µg/ml et 5 x 10^{-4}M respectivement. IF 1 et IF 2 ont été obtenus selon les méthodes de Herzberg et coll. (368) et de Donnel et Thach (369) respectivement. Les ribosomes ont été purifiés selon la méthode de Zimmerman et coll. (345). L'activité GTPase a été mesurée dans les conditions décrites par Kolakofski et coll. (370).

du Phe tRNA sur le ribosome dépendante de EF Tu est complètement inhibée par la tétracycline (tableau XXVIII), antibiotique qui interfère avec l'activité du site A du ribosome. Cette réaction de fixation du Phe tRNA dépendante du facteur EF Tu est inhibée par l'addition de ppGpp (tableau XXVIII).

De plus, le nucléoside tétraphosphate empêche la formation du complexe EF Tu - GTP (tableau XXIX). Ces résultats confirment donc ceux de Blumenthal et coll. (262).

4. - Action du nucléoside tétraphosphate sur la réaction de polymérisation des chaines peptidiques.

Le complexe [^{3}H] - Phe tRNA - EF Tu - ribosome a été préformé selon les conditions décrites par Thang et coll. (341) en utilisant des ribosomes dépourvus de facteur EFG préparés selon la technique de Zimmerman et coll. (345). L'addition de molécules de EFG à ce complexe permet la polymérisation des chaines de polyphénylalanine. Dans ces conditions, la quantité de [^{3}H] - Phe tRNA présente dans les produits TCA insolubles à chaud en présence du facteur EFG, permet de mesurer le taux de polymérisation des chaines de polyphénylalanine.

Le ppGpp utilisé à une concentration de 0.8 mM qui inhibe à 83 % la fixation du Phe tRNA sur le ribosome (tableau XXIX) modifie peu le taux de polymérisation des chaines de polyphénylalanine une fois que le Phe tRNA a été fixé sur le ribosome (tableau XXX). Ce résultat confirme les observations présentées dans la figure 50 qui nous permettaient de conclure que

TABLEAU XXVIII

EFFET DU ppGpp SUR LA FIXATION DU [^{3}H] Phe tRNA, EF Tu DEPENDANTE SUR LES RIBOSOMES

Additions	pmoles de [3H]Phe-tRNA fixé			% inhibition
	- EF Tu	+ EF Tu	Δ	
Contrôle	1.10	8.20	7.10	-
+ ppGpp	0.70	1.95	1.25	83
+ tétracycline	0.90	1.30	0.40	95

Le milieu d'incubation contient : Tampon A (Tris pH, 7.5, 50 mM, $MgCl_2$, 2 mM; KCl 80 mM; dithiothreitol 5 mM), ribosomes lavés au chlorure d'ammonium molaire, 4.0 unités A260 nm; Phe tRNA (total tRNA : 55.0 A260 nm unités/ml) 20 µl; EFTu 10 µg; GTP 0.1 mM; quand nous l'indiquons, ppGpp et tétracycline ont été additionnés à une concentration égale à 0.8 mM et 0.4 mM respectivement. L'incubation a été réalisée pendant 20 minutes à 25° C, puis immédiatement diluée par addition d'1 ml de tampon A à 4° C et filtrée sur membrane de nitrocellulose. Les filtres ont été lavés plusieurs fois avec le tampon A à 4° C, séchés et leur radioactivité ait été mesurée.

TABLEAU XXIX

EFFET DU ppGpp SUR LA FORMATION DU COMPLEXE EF Tu - GTP

Addition du facteur EF Tu	pmoles de GTP fixé		% inhibition
	contrôle	+ ppGpp	
8 µg.	2.9	2.0	32
20 µg.	6.5	3.2	52

Le milieu d'incubation contient dans 100 µl : tampon B (Tris H 7.5, 50 mM; KCl 80 mM; dithiothreitol 5 mM); $MgCl_2$ 10 mM; GTP ^{32}P, 4.4 µM. Le ppGpp est utilisé à la concentration de 0.4 mM. La formation du complexe EF-Tu a été effectuée dans les conditions décrites par Thang et coll. (371).

TABLEAU XXX

EFFET DU ppGpp SUR LA SYNTHESE DE POLYPHENYLALANINE A PARTIR DE [^{3}H] Phe tRNA PREFIXE SUR LES RIBOSOMES

Addition	pmoles de [3H] phénylalanine incorporée			% inhibition
	- facteur EF Tu	+ facteur EF Tu	Δ	
Contrôle	0.75	8.50	7.90	-
+ ppGpp	0.80	7.40	6.60	16

La fixation du [^{3}H] Phe tRNA sur les ribosomes a été effectuée dans les conditions décrites tableau XXVII. Après que le complexe [^{3}H] Phe tRNA-EF Tu-ribosome ait été préformé selon la technique décrite par Thang et coll. (341), le facteur EFG (4 µg pour 100 µl de milieu d'incubation) a été ajouté. L'incubation est réalisée à 37° C pendant 15 minutes. Les échantillons sont précipités par addition de TCA 5 % à 4° C, puis portés à ébullition pendant 10 minutes.

Le ppGpp a été utilisé à une concentration de 0.8 mM. Les facteurs EF Tu et EFG nous ont été fournis par le Dr. Thang.

les activités du facteur EFG et de la peptidyltransférase n'étaient pas modifiées par la présence du ppGpp.

5. - Activité du ppGpp sur les facteurs de la traduction.

Nous avons montré que pour des concentrations en ppGpp comprises entre 10^{-4}M et 10^{-3}M des activités des facteurs EF Tu et IF 2 étaient inhibées. De telles concentrations en nucléoside tétraphosphate sont compatibles avec celles observées in vivo au cours de l'accumulation de MSI induite par une carence en acide aminé de bactéries Rel A^+ (338).

L'inhibition de EF Tu par le produit MSI a été observée par d'autres laboratoires (262,346). Arai et coll.(346) ont montré que le ppGpp se fixait sur le facteur EF Tu en compétition avec le GDP. De plus, il a été proposé que le facteur EF Tu présent dans le complexe ψ_r constituerait la cible du ppGpp dans son action éventuelle sur la transcription des RNA ribosomiques (217,266).

Le fait que l'activité de IF 2 soit modifiée par MSI est en accord avec les résultats de Yoshida et coll.(347), publiés à la même date que nos propres travaux (348), et qui montraient une inhibition de la formation du complexe d'initiation par le ppGpp.

Il est intéressant de noter que le nucléoside tétraphosphate ne se comporte pas comme un simple analogue du GTP. En effet, il n'inhibe pas la fonction du facteur EFG comme le fait, par exemple, le GMP-PCP. Nos résultats sont sur ce point en contradiction avec ceux de Arai et coll.(346)

qui observent que l'hydrolyse du GTP par le facteur EFG est partiellement inhibée par le ppGpp, mais avec une efficacité deux fois plus faible que celle observée en présence de GDP. Si comme le proposent Arai et coll. (346), le ppGpp inhibe l'activité du facteur EFG, on comprend mal comment ce facteur pourrait être nécessaire à la synthèse du nucléoside tétraphosphate comme l'ont montré Haseltine et coll. (349). De plus, plusieurs mutants thermosensibles qui affectent le facteur EFG chez des souches Rel A^+ ont été isolés (269,270). Aux températures non permissives, ces bactéries carencées en acide aminé présentent le phénotype des souches Rel A^- privées d'acide aminé. En effet, on observe une dégradation du ppGpp corrélative à une synthèse de RNA stable en absence de traduction (269,270). Donc, l'activité du facteur EFG semble nécessaire à la formation de MSI même si la protéine n'est pas, comme il avait été proposé, directement impliquée dans cette synthèse (271,350).

CONCLUSION

DEUX FORMES DE CONTROLE DE L'EXPRESSION GENETIQUE AU NIVEAU DE LA TRADUCTION

Nous avons décrit dans ce chapitre deux phénomènes susceptibles de rendre compte de mécanismes qui interviennent au niveau de la traduction et participent ainsi à la régulation de l'expression génétique chez Escherichia coli.

Le premier décrit la modification de l'activité du facteur IF 3 en relation avec le fonctionnement du cycle ribosomique. Dès lors que ce dernier est très affecté (présence de chloramphénicol, phase stationnaire de la croissance), le facteur IF 3 est soumis à un processus d'inactivation alors que les fonctions des facteurs IF 1 et IF 2 ne sont que peu modifiées.

Une telle observation invite à s'interroger sur la participation du facteur IF 3 dans la régulation de l'expression génétique notamment au cours des variations du taux de croissance bactérien : μ . Nous avons rappelé dans l'introduction à ce chapitre qu'en fonction de μ la quantité de ribosomes/DNA augmentait alors que le rapport protéine soluble/DNA restait constant et que la fraction de ribosomes présente dans les polysomes ne variait pas. De plus, les mesures relatives à la vitesse d'élongation des chaines peptidiques amenaient à penser que les variations du taux de synthèse protéique à différents taux de croissance cellulaire devaient résulter

d'une modification du nombre de chaines peptidiques en cours d'élongation. Or, ce nombre est dépendant de la quantité de sous-unités natives disponibles responsables du fonctionnement du mécanisme d'initiation de la traduction. Le fait que le facteur IF 3, par son activité antiassociante règle le pool de sous-unités natives présentes dans la cellule, permet de proposer sa participation à la régulation du nombre de chaines peptidiques en croissance. De plus, on sait que ce facteur est très limitant. Selon certains auteurs, il en existerait une molécule pour 20 sous-unités 30 S (351).

Par ailleurs, une observation récente (352) indique qu'au cours d'une modification du taux de croissance de cellules maintenues en phase exponentielle (condition de "shift up") l'activité des facteurs d'initiation n'est modifiée que 20 minutes après l'enrichissement nutritionnel du milieu. Nous avons rappelé qu'au cours d'un "shift up", on observait un accroissement immédiat de la synthèse des composants ribosomiques à un taux supérieur à celui caractéristique des nouvelles conditions de croissance; cette modification précédait la variation du taux de synthèse des produits solubles (voir l'introduction à ce chapitre). Si ce résultat relatif au dosage de l'activité des facteurs d'initiation était confirmé, il pourrait indiquer que le taux de synthèse des protéines solubles de la cellule est augmenté dès lors que l'activité du cycle ribosomique a été modifiée en relation avec les nouvelles conditions de culture.

Le fait que le facteur IF 3 apparaisse plus instable in vivo que les autres facteurs d'initiation peut conférer à

cette molécule un rôle de modulation du taux de synthèse protéique en fonction du taux de croissance cellulaire.

Le second phénomène que nous avons étudié est relatif à un mécanisme de contrôle de la cellule en réponse à un arrêt de la traduction. Ce mécanisme très efficace fonctionne comme un système de sécurité en induisant l'inhibition d'un grand nombre de réaction cellulaire. Il est intéressant de noter qu'il affecte, au niveau de la traduction, les fixations de l'aminoacyl-tRNA initiateur catalysées par le facteur IF 2 et des autres aminoacyl-tRNA, EF Tu dépendantes, réactions qui utilisent du GTP. L'activité du facteur EFG qui participe à la synthèse du ppGpp ne se trouve pas modifiée par le nucléoside tétraphosphate.

Ce mécanisme de sécurité semble accroitre la capacité d'adaptation de la cellule aux variations en acide aminé de la composition du milieu. C'est ainsi qu'au cours d'une diminution du taux de croissance cellulaire provoquée par le passage d'un milieu de culture riche en acide aminé vers un milieu qui en est dépourvu, la dérépression des enzymes responsables de la synthèse des acides aminés est plus rapide chez des bactéries Rel A^+ que chez des bactéries Rel A^- (353, 354).

CONCLUSION GENERALE

Les travaux que nous venons de présenter confirment le processus séquentiel de la biosynthèse des ribosomes, leur fonction polyenzymatique, et proposent certains mécanismes qui, en contrôlant l'activité ribosomique, participent à la régulation de l'expression génétique.

La modification de la croissance cellulaire favorise l'accumulation de trois types de particules ribonucléoprotéiques 30 S, et 45 S, 50 S qui sont respectivement les précurseurs normaux des sous-unités ribosomiques 30 S et 50 S. La restauration en phosphore de bactéries inhibées dans la synthèse active de leurs protéines, est une situation qui permet de préciser l'importance des méthylations "tardives" des rRNA macromoléculaires dans l'assemblage des sous-unités ribosomiques. Nous avons montré que certains événements qui font appel à des activités nucléolytiques impliquées dans la maturation des rRNA se produisent en absence de synthèse protéique active dès lors qu'un pool intracellulaire de protéines ribosomiques libres est disponible. Ainsi certains des mécanismes postranscriptionnels des rRNA macromoléculaires ont lieu après intégration des molécules précurseurs de ces RNA dans des particules ribonucléoprotéiques.

L'étude des effets des fragments immuns monovalents Fab dirigés contre chacune des protéines de la sous-unité 30 S, dans la traduction des mRNA naturels ou dans les activités particulières à certaines étapes de la synthèse protéique, nous a permis

de proposer une classification de ces protéines en relation avec différentes fonctions du ribosome. Une telle proposition a été confrontée avec les travaux relatifs à la structure ou la fonction de la sous-unité 30 S effectués dans d'autres laboratoires à l'aide de techniques étrangères au domaine de l'immunologie.

Différents modes d'inhibition in vivo de la synthèse protéique nous ont permis d'établir une correspondance entre la stabilité relative des facteurs d'initiation de la traduction et l'activité du cycle des ribosomes. Quand l'échange des sous-unités ribosomiques avec les complexes mRNA-ribosomes est inhibé, l'"activité facteur IF 3" se trouve principalement affectée. Les ribosomes protègent le facteur IF 3 de cette perte d'activité qui est aussi observée in vitro. Cette instabilité du facteur IF 3 semble liée in vitro à la participation de la molécule à un complexe préformé présent dans un extrait brut de facteurs d'initiation. Un tel extrait induit une incorporation de ^{32}P à partir de l'ATP γ ^{32}P dans un produit aux propriétés analogues à celles d'un polyphosphate.

A côté de ce mécanisme de stabilité relative des facteurs d'initiation qui pourrait réguler le fonctionnement du cycle ribosomique, nous avons montré que le nucléoside tétraphosphate, le ppGpp dont la synthèse est dirigée par le produit du gène Rel A^+, inhibe in vitro les fixations des aminoacyl tRNA, IF 2 et EF Tu dépendantes, sur le ribosome. Ce nucléoside tétraphosphate qui participe au contrôle stringent dépendant des acides aminés, n'affecte pas dans les mêmes conditions l'activité de la peptidyltransferase ou la fonction du facteur EFG.

Stabilité du facteur IF 3 et accumulation de ppGpp sont deux mécanismes qui témoignent de l'existence de régulations de l'expression génétique au niveau de la traduction chez Escherichia coli.

BIBLIOGRAPHIE

1 KAEMPFER, R. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 61, 106.

2 KAEMPFER, R., MESELSON, M. et RASKAS, H.J. (1968). J. Mol. Biol., 31, 277.

3 VOYNOW, P. et KURLAND, C.G. (1971). Biochemistry 10, 517.

4 WEBER, H.J. (1972). Mol. Gen. Genet. 119, 233.

5 DEUSSER, E. et WITTMANN, H.G. (1972). Nature, 238, 269.

6 DEUSSER, E. (1972). Mol. Gen. Genet., 119, 249.

7 FELLNER, P. et EBEL, J.P. (1970). Nature, 225, 1131.

8 FELLNER, P., EHRESMANN, C. et EBEL, J.-P. (1970). Nature, 225, 26.

9 MUTO, A. (1970). Biochemistry, 9, 3683.

10 JARRY, B. et ROSSET, R. (1971). Mol. Gen. Genet., 113, 43.

11 YANKOFSKY, S.A. et SPIEGELMAN, S. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 1466.

12 ATTARDI, G., HUANG, P.C. et KABAT, S. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 53, 1490.

13 SMITH I., DUBNAU, D., MORRELL, P. et MARMUR, J. (1968). J. Mol. Biol., 33, 123.

14 NEIDHART, F.C. dans J.N. Davidson et W.E. Cohn, "Progress in nucleic Acid Research", vol. 3, p. 145.

15 MAALØE, O. et KJELDGAARD, N.O. (1966) : Control of macromolecular synthesis. New York : W.A. Benjamin Inc.

16 BRITTEN, R.J., Mac CARTHY, J.B. et ROBERTS, R.B. (1962). Biophys. J., 2, 57.

17 OSAWA, S. (1968). Ann. Rev. Biochem., 37, 109.

18 ATTARDI, G. et AMALDI, F. (1970). Ann. Rev. Biochem., 39, 183.

19 MANGIAROTTI, G., APIRION, D., SCHLESSINGER, D. et SILENGO, L. (1968). Biochemistry, 7, 456.

20 GIERER, L. et GIERER, A. (1968). J. Mol. Biol., 34, 293.

21 HAYES, F. et HAYES, D. (1971). Biochimie, 53, 369.

22 MITSUI, H., ISHIHAMA, A. et OSAWA, S. (1963). Biochem. Biophys. Acta, 61, 696.

23 KONO, M. et OSAWA, S. (1964). Biochem. Biophys. Acta, 87, 326.

24 YOSHIDA, K. et OSAWA, S., cité par Osawa S. (1968). Ann. Rev. Biochem., 37, 109.

25 OSAWA, S. OTAKA, E., ITOH, T. et FUKUI, T. (1969). J. Mol. Biol., 40, 321.

26 SUZUKI, H. et HAYASHI, Y. (1964). Biochem. Biophys. Acta, 87, 610.

27 PARDEE, A.B., PAIGEN, K. et PRESTIDGE, L.S. (1957). Biochem. Biophys. Acta, 24, 215.

28 NOMURA, M. et WATSON, J.D. (1959). J. Mol. Biol., 1, 204.

29 HOSOKAWA, K. et NOMURA, M. (1965). J. Mol. Biol., 12, 225.

30 DUBIN, D.T. (1964). J. Mol. Biol., 8, 749.

31 TAKEDA, Y., HAYASHI, S.I., HAKAGAWA, H. et SUZUKI, F.(1960). J. Biochem., (Tokyo), 48, 169.

32 DAGLEY, S., WHITE, A.E., WILD, D.G. et JYKES, J. (1962). Nature, 194, 25.

33 HOLMES, I.A. et WILD, D.G. (1965). Biochem. J., 97, 277.

34 TURNOCK, G. et WILD, D.G. (1963). Nature, 197, 597.

35 ENNIS, H.L. et LUBIN, M. (1965). Biochem. Biophys. Acta, 95, 605.

36 NEIDHARDT, F.C. et EIDLIC, L. (1963). Biochem. Biophys. Acta, 68, 380.

37 NAKADA, O., ANDERSON, J.A.C. et MAGASANIK, B. (1964). J. Mol. Biol., 9, 472.

38 NOMURA, M. et HOSOKAWA, K. (1965). J. Mol. Biol., 12, 242.

39 HOROWITZ, J. et HILLS, D.C. (1966). Biochem. Biophys. Acta, 123, 416.

40 NAKADA, D. et MARQUISEE, M.J. (1965). J. Mol. Biol., 13, 351.

41 SCHLEIF, R.F. (1968). J. Mol. Biol., 37, 119.

42 GIRARD, M., BALTIMORE, D. (1966). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 56, 999.

43 YOSHIDA, K. et OSAWA, S. (1968). J. Mol. Biol., 33, 559.

44 GUTHRIE, C., NASHIMOTO, H. et NOMURA, M. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 63, 384.

45 GUTHRIE, C., NASHIMOTO, H. et NOMURA, M. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 69.

46 NASHIMOTO, H., HELD, W., KALTSCHMIDT, E. et NOMURA, M. (1971). J. Mol. Biol., 62, 121.

47 FEUNTEUN, J., MONIER, R., VOLA, C. et ROSSET, R. (1974). Nucleic Acid Research, 1, 147.

48 LOWRY, C.W. et DAHLBERG, J.E. (1971). Nature New Biol., 232,52

49 LEWANDOSKI, L.J. et BROWNSTEIN, B.L. (1966). Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 554.

50 Mac DONALD, R.E., TURNOCK, G. et FORCHAMMER, J. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 57, 141.

51 TURNOCK, G. (1969). Mol. Gen. Genet., 104, 295.

52 MESELSON, M., NOMURA, M., BRENNER, S., DAVERN, C. et SCHLESSINGER, D. (1964). J. Mol. Biol., 9, 696.

53 MARCOT QUEIROZ, J. et MONIER, R. (1966). Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 446.

54 LERMAN, M.I., SPIRIN, A.S., GRAVILOVA, L.P. et GOLOV, V.F. (1966). J. Mol. Biol., 15, 268.

55 MARCOT QUEIROZ, J. et MONIER, R. (1967). Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 477.

56 SIDDIQUI, M.A.Q. et HOSOKAWA, K. (1968). Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 1.

57 AUBERT, M., MONIER, R., REYNIER, M. et SCOTT, J.F. (1968). dans Structure and Function of transfer RNA and 5S RNA, ed. Fröholm L.O. et Laland S.G., Universitets forlaget, Oslo, 150.

58 NOMURA, M. (1970). Bacteriol. Rev., 34, 228.

59 GARRETT, R.A. et WITTMANN, H.G. (1973). Advances in Proteins Chemistry, 27, 277.

60 TRAUB, C. et NOMURA, M. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 59, 777.

61 OTAKA, E., ITOH, T. et OSAWA, S. (1967). Science, 157, 1452.

62 COLLI, W. et OISHI, M. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 64, 642.

63 DOOLITTLE, W. et PACE, N.R. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 1786.

64 PETTIJOHN, D.E., CLARKSON, K., KOSSMAN, C.R. et STONINGTON, O.G. (1970). J. Mol. Biol., 52, 281.

65 HAYES, F., HAYES, D., FELLNER, P. et EHRESMANN, C. (1971). Nature New Biol., 232, 54.

66 SOGIN, M., PACE, B., PACE, N.R. et WOESE, C.R. (1971). Nature New Biol., 232, 48.

67 BROWNLEE, G.G. et CARTWRIGHT, E. (1971). Nature New Biol., 232, 51.

68 MONIER, R., FEUNTEUN, J., FORGET, B., JORDAN, B., REYNIER, M., et VARRICHIO, F. (1969). Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol., 34, 139.

69 DUBIN, D.T. et GÜNALP, A. (1967). Biochem. Biophys. Acta, 134, 106.

70 NICHOLS, J.L. et LANE, B.G. (1967). J. Mol. Biol., 30, 477.

71 STARR, J.L. et FEFFERMAN, R. (1964). J. Biol. Chem., 239,3457.

72 FEUNTEUN, J. (1973). Thèse de doctorat es-Sciences Physiques, Université de Paris VII, Paris.

73 JULIEN, J., ROSSET, R. et MONIER, R. (1967). Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 233.

74 COHEN, G.N. et MUNIER, R. (1959). Biochem. Biophys. Acta, 31, 347.

75 MUNIER, R. et COHEN, G.N. (1956). Biochem. Biophys. Acta, 21, 592.

76 MUNIER, R. et COHEN, G.N. (1959). Biochem. Biophys. Acta, 31, 378.

77 TURNOCK, G. et WILD, D.G. (1966). Biochem. Biophys. Acta, 123, 402.

78 KEPES, A. (1967). Biochem. Biophys. Acta, 138, 107.

79 WALLER, J.P. (1964). J. Mol. Biol., 10, 319.

80 COHEN, G.N. et RICKENBERG, H.N. (1956). Ann. Inst. Pasteur, 91, 693.

81 MANDELL, J.D. et HERSHEY, A.E. (1960). Analyt. Biochem.,1, 66.

82 ROSSET, R., MONIER, R. et JULIEN, J. (1964). Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 87.

83 WOESE, C., NAONO, S., SOFFER, R. et GROS, F. (1963). Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 435.

84 SYPHERD, P.S. (1965). J. Bacteriol., 90, 403.

85 KONO, M., OTAKA, E. et OSAWA, S. (1964). Biochem. Biophys. Acta, 91, 612.

86 DUBIN, D.T. et ELKORT, A.T. (1964). J. Mol. Biol., 10, 50.

87 HECHT, N.B. et WOESE, C.R. (1968). J. Bacteriol., 95, 986.

88 MANGIAROTTI, G. et SCHLESSINGER, D. (1966). J. Mol. Biol., 20, 123.

89 SCHLEIF, R.F. (1967). J. Mol. Biol., 27, 41.

90 DALGARNO, L. et GROS, F. (1968). Biochem. Biophys. Acta, 157, 52.

91 BRAY, G.P. (1960). 1, 279.

92 BEAUD, G. et HAYES, D. (1971). Eur. J. Biochem., 19, 323.

93 LEIVE, L. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 53, 745.

94 LAI, C.J. et WEISBLUM, B. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 856.

95 HELSER, T.L., DAVIES, J.E. et DAHLBERG, J.E. (1971). Nature New Biol., 233, 12.

96 BOWMAN, C.M., DAHLBERG, J.E., IKEMURA, I., KONISKY, J. et NOMURA, M. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 964.

97 SENIOR, B.W. et HOLLAND, I.B. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 959.

98 SCHWEIGER, M. (1972). Résultats non publiés, cités par Garrett R.A. et Wittmann H.G. (1973) in Advances in Protein Chemistry, 27, 277.

99 FELLNER, P., EHRESMANN, C., STIEGLER, P. et EBEL, J.P.(1972). Nature New Biol., 239, 1.

100 KURLAND, C.G., NOMURA, M. et WATSON, J.D. (1962). J. Mol. Biol., 4, 388.

101 DAGLEY, S., TURNOCK, G. et WILD, D.G. (1963). Biochem. J., 88, 555.

102 OSAWA, S., TAKATA, K. et HOTTA, Y. (1958). Biochem. Biophys. Acta, 28, 271.

103 JEANTET, C. (1967). DEA de Biochimie, Faculté des Sciences de Marseille.

104 GALIBERT, F., LELONG, J.C. et LARSEN, C.J. (1967). C.R. Acad. Sci., Ser D, 265, 279.

105 JORDAN, B.R., FORGET, B.G. et MONIER, R. (1971). J. Mol.Biol., 55, 407.

106 JORDAN, B.R., FEUNTEUN, J. et MONIER, R. (1970). J. Mol.Biol., 50, 605.

107 HOROWITZ, J. et CHARGAFF, E. (1959). Nature, 184, 1213.

108 ANDOH, T. et CHARGAFF, E. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 54, 1181.

109 IWABUCHI, M., OTAKA, E., KONO, M. et OSAWA, S. (1966). Biochem. Biophys. Acta, 95, 83.

110 HILLS, D.C. et HOROWITZ, J. (1966). Biochemistry, 5, 1625.

111 BUSSARD, A., NAONO, S. GROS, F. et MONOD, J. (1960). Compt. Rend., 250, 4049.

112 CHAMPRE, S.P. et BENZER, S. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 532.

113 BOWMAN, C.M., SIDIKARO, J. et NOMURA, M. (1971). Nature New Biol., 234, 133.

114 CRICHTON, R.R. et WITTMANN, H.G. (1971). Mol. Gen. Genet., 114, 95.

115 LELONG, J.C., GROS, D., GROS, F., BOLLEN, A., MASCHLER, R. et STÖFFLER, G. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 248.

116 LINDAHL, L. (1975). J. Mol. Biol., 92, 15.

117 MICHAELS, G.A. (1972). J. Bacteriol., 110, 889.

118 NIERHAUS, K.H., BORDASCH, K. et HOMANN, H.E. (1973). J. Mol. Biol., 74, 587.

119 TERHORST, C., WITTMANN, H.G., LIEBOLD, B. et WOLLER, W. (1972). Eur. J. Biochem., 25, 13.

120 CHANG, C.N. et CHANG, F.N. (1974). Nature, 251, 731.

121 ALIX, J.H. et HAYES, D. (1974). J. Mol. Biol., 86, 139.

122 CHANG, C.N. et CHANG, F.N. (1975). Biochemistry, 14, 468.

123 GALIBERT, F., TIOLLAIS, P., SANFOURCHE, F. et BOIRON, M. (1971). Eur. J. Biochem., 20, 381.

124 FORGET, B.G. et JORDAN, B.R. (1970). Sciences, 167, 382.

125 FEUNTEUN, J. JORDAN, B.R. et MONIER, R. (1970). Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 979.

126 SOGIN, M.L., PECHMAN, K.J., ZABLEN, L., LEWIS, B.J. et WOESE, C.R. (1972). J. Bacteriol., 112, 13.

127 VASSEUR, M. (1975). Doctorat 3ème Cycle, Université de Paris VII, Paris.

128 THAMMANA, P. et HELD, W.A. (1974). Nature, 251, 682.

129 MEYHACK, B., MEYHACK, J. et APIRION, D. (1974). FEBS Letters, 49, 215.

130 KURLAND, C.G. (1972). Ann. Rev. Biochem., 41, 377.

131 MANGIAROTTI, G., TURCO, E., PERLO, C. et ALTRUDA, F. (1975). Nature, 253, 569.

132 TRAUB, P. et NOMURA, M. (1969). J. Mol. Biol., 40, 391.

133 CHENG, T. et HARTMAN, K.A. (1968). J. Mol. Biol., 31, 191.

134 TAI, P.C., WALLACE, B.J. et DAVIS, B.O. (1973). Biochemistry, 12, 616.

135 NOMURA, M., MIZUSHIMA, S., OSAKI, M., TRAUB, P. et LOWRY, C.V. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 49.

136 TRAUB, P., HOSOKAWA, K. CRAVEN, G.R. et NOMURA, M. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 58, 2430.

137 RANDALL-HAZELBAUER, L.L. et KURLAND, C.G. (1972). Mol. Gen. Genet., 115, 234.

138 MARSH, R.C. et PARMEGGIANI, A. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 70, 40.

139 CANTOR, C.R., PELLEGRINI, M. et OEN, H. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory,pp. 573.

140 BOLLEN, A., HEIMARK, R., KAHAN, L., COZZONE, A., TRAUT, R. et HERSHEY, J. cité par Traut et al. (1974) in Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 271.

141 HEIMARK, R., KAHAN, L., JOHNSTON, K., HERSHEY, J. et TRAUT, R. cité par Traut et al. (1974) in Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 271.

142 RUMMEL, D.P. et NOLLER, H.F. (1973). Nature New Biol., 245,72.

143 FUNATSU, G. et WITTMANN, H.G. (1972). J. Mol. Biol., 68, 547.

144 HELSER, T.L., DAVIES, J.E. et DAHLBERG, J.E. (1972). Nature New Biol., 235, 6.

145 MONRO, R.E. (1967). J. Mol. Biol., 25, 347.

146 MÖLLER, W. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 711.

147 VAN HOLDE, K.E. et HILL, W.E. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 53.

148 STÖFFLER, G., HASENBANK, R., LUTGEHAUS, M., MASCHLER, R., MORRISON, C.A., ZEICHARDT, H. et GARRETT, R.A. (1973). Molec. Gen. Genet., 127, 89.

149 STÖFFLER, G. et WITTMANN, H.G. (1971). J. Mol. Biol., 62, 407.

150 TISCHENDORF, G.W., STÖFFLER, G. et WITTMANN, H.G. (1974). Eur. J. Biochem.,

151 JEANTET, C., MASCHLER, R., CREPIN, M., THIBAULT, J., LELONG, J.C., GROS, F. et STÖFFLER, G. (1975). En cours de publication.

152 HELD, W.A., MIZUSHIMA, S. et NOMURA, M. (1973). J. Biol. Chem., 248, 5720.

153 RANDALL-HAZELBAUER, L.L. et KURLAND, C.G.(1972). Mol. Gen. Genet., 115, 234.

154 HELD, W.A. et NOMURA, M. (1975). J. Biol. Chem., 250, 3179.

155 BOLLEN, A., MASCHLER, R. et STÖFFLER, G., résultats non publiés.

156 SHIH, C.H. Ting et CRAVEN, G.R. (1973). J. Mol. Biol.,78,651.

157 MOORE, P.B. (1971). J. Mol. Biol., 60, 169.

158 GINZBURG, J., MISKIN, R., et ZAMIR, A. (1973). J. Mol. Biol., 79, 481.

159 HIGHLAND, J.H., OCHSNER, E., GORDON, E., HASENBANK, R. et STÖFFLER, G. (1974). J. Mol. Biol., 86, 175.

160 PONGS, O. et LANKA, E.(1975). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 72, 1505.

161 PONGS, O., LANKA, E. et BALD, R. (1975). FEBS Meeting, Paris, 1975.

162 STÖFFLER, G. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 615.

163 MORRISON, C.A., GARRETT, R.A., REICHARDT, H. et STÖFFLER,G. (1973). Mol. Gen. Genet., 127, 359.

164 LITMAN, D.J. et CANTOR, C.R. (1974). Biochemistry, 13, 512.

165 MICHALSKI, C.J. et SELLS, B. (1974). Eur. J. Biochem.,49, 361.

166 STÖFFLER, G., DAYA, L., RAK, W. et GARRETT, R.A. (1971). J. Mol. Biol., 62, 411.

167 HIGLAND, J.H., OEHSNER, E., GORDON, J., BODLEY, R., HASENBANK, R. et STÖFFLER, G. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 627.

168 CRAVEN, G.R., GAVIN, R. et FANNING, T. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 129.

169 TRAUB, P. et NOMURA, M. (1968). J. Mol. Biol., 34, 575.

170 TRAUT, R.R., HEIMARK, R.L., SUN, T.T., HERSHEY, J.W.B. et BOLLEN, A. (1974). Dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 271.

171 SUN, T.T., BOLLEN, A., KAHAN, L. et TRAUT, R. (1974). Biochemistry, 13, 2334.

172 KAHAN, L. et KALTSCHMIDT, E. (1972). Biochemistry, 11, 2691.

173 VAN DUIN, J. KNIPPENBERG Van, P.H., DIEBEN, M. et KURLAND, C.G. (1972). Mol. Gen. Genet., 116, 181.

174 DE GROOT, N., PANET, A. et LAPIDOT, Y. (1971). Eur. J. Biochem., 23, 523.

175 MOORE, G. et CRICHTON, R.R. (1974). Biochem. J., 143, 607.

176 OZAKI, M., MIZUSHIMA, S. et NOMURA, M. (1969). Nature, 222, 333.

177 LAZAR, M. et GROS, F. (1973). Biochimie, 55, 171.

178 HELD, W.A., GETTE, W.R. et NOMURA, M. (1974). Biochemistry, 13, 2115.

179 LUTTER, L.C., BODE, U., KURLAND, C.G. et STÖFFLER, G. (1974). Mol. Gen. Genet., 129, 167.

180 CHANG, F.N. et FLAKS, J.G. (1972). J. Mol. Biol., 68, 177.

181 LUTTER, L.C., ZEICHHARDT, H., KURLAND, C.G. et STÖFFLER, G. (1972). Mol. Gen. Genet., 119, 357.

182 CHANG, F.N. et FLAKS, J.G. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 67, 1321.

183 CLEGG, C. et HAYES, D. (1974). Eur. J. Biochem., 42, 21.

184 NOMURA, M. et HELD, W.A. (1974) dans Ribosomes, Nomura, M., Tissières, A. et Lengyel, P. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 193.

185 DAHLBERG, A.E. (1974). J. Biol. Chem., 249, 7673.

186 VAN DIEGEN, G., VAN DER LAKEN, C.J., KNIPPENBERG, P.H. et VAN DUIN, J. (1975). J. Mol. Biol., 93, 351.

187 TAL, M., AVIRAM, M., KANOREK, A. et WEISS, A. (1972). Biochem. Biophys. Acta, 281, 381.

188 SZER, W., HERMOSO, J.M. et LEFFLER, S. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 72, 2325.

189 SHINE, J. et DALGARNO, L. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 1342.

190 EHRESMANN, C., STIEGLER, P. et EBEL, J.P. (1975). FEBS Letters, 49, 47.

191 INOUYE, H., POLLACK, Y.et PETRE, J. (1974). Eur. J. Biochem., 45, 109.

192 WAHBA, A.J., MILLER, M.J., NIVELEAU, A., LANDERS, T.A., CARMICHAEL, G.C., WEBER, K., HAWLEZ, O. et SLOBLIN, L.J. (1974). J. Biol. Chem., 249, 3314.

193 GOODMAN, H.M., BILLETER, M.A., HINDLEY, J. et WEISSMAN,C. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 67, 921.

194 GARRETT, R.A., RAK, K.H., DAYA, L. et STÖFFLER, G. (1971). Mol. Gen. Genet., 114, 112.

195 ZIMMERMAN, R.A. (1974) dans Ribosomes, Nomura, M., Tissières, A. et Lengyel, P., Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 225.

196 BARRITAULT, D., EXPERT-BEZANCON, A., MILET, M. et HAYES, D.H. (1975). FEBS Letters, 50, 114.

197 UNGEWICKELL, E., GARRETT, R., EHRESMANN, C., STIEGLER, P. et FELLNER,P. (1975). Eur. J. Biochem., 51, 165.

198 Van KNIPPENBERG, P.H. (1975). Nucleic Acid Res., 2, 79.

199 ZIMMERMAN, R.A., CARVIN, R.T. et GORINI, L. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 2263.

200 ROSSET, R. et GORINI, L. (1969). J. Mol. Biol., 39, 95.

201 HASENBANK, R., GUTHRIE, C., STÖFFLER, G., WITTMANN, H.G., ROSEN, L. et APIRION, D. (1973). Mol. Gen. Genet., 127,1.

202 GORINI, L. (1971). Nature New. Biol., 234, 261.

203 LÜHRMANN, R. et GASSEN, H.G. (1975). FEBS Meeting Paris.

204 GREENWELL, P., HARRIS, R.J. et SYMONS, R.H. (1974). Eur. J. Biochem., 49, 539.

205 ERDMANN, V.A., SPRINZL, M. et PONGS, O. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 942.

206 MONIER, R. (1972) dans The Mechanism of protein synthesis and its regulation, Bosch, L. editor North-Holland (Amsterdam - London).

207 JACOB, F. et MONOD, J. (1961). J. Mol. Biol., 3, 318.

208 BERTRAND, K., KORN, L. LEE, F., PLATT, T., SQUIRES, C.L., SQUIRES, C. et YANOFSKY, C. (1975). Science , 189, 22.

209 GROS, F. (1974). FEBS Letters, 40, S 19.

210 COMTESSE, G., CREPIN, M., GROS, F., ULLMANN, A. et MONOD J. (1970). dans The lactose operon (Beckwith, J. et Zipser, D., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 401.

211 ULLMANN, A. (1971). Biochimie, 53, 3.

212 TRAVERS, A.A. et BURGESS, R.R. (1969). Nature, 222, 537.

213 ROBERTS, J.W. (1969). Nature, 224, 1168.

214 GHOSH, S. et ECHOLS, H. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 69, 3660.

215 MUROOKA, Y. et LAZZARINI, R.A. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 69, 2336.

216 RAMAKRISHNAN, T. et ECHOLS, H. (1973). J. Mol. Biol., 78, 675.

217 TRAVERS, A., KAMEN, D. et CASHEL, M. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 415.

218 JACQUET, M., CUKIER-KAHN, R. PLA, J. et GROS, F. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1597.

219 CUKIER-KAHN, R., JAQUET, M. et GROS, F. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 69, 3642.

220 KAGAWA, H. et EGBERTS, E. (1974). Eur. J. Biochem., 49, 293.

221 ROUVIERE-YANIV, J. et GROS, F. (1975). FEBS Meeting Paris.

222 ABOUD, M. et PASTAN, I. (1975). J. Biol. Chem., 250, 2189.

223 KOURILSKY, P. et GROS, F. (1973). Fogarty Symposium - Proceedings of the International Fogarty Conferences on the regulation in cultured cells. pp. 19.

224 LITTAUER, U.Z. et INOUYE, H. (1973). Ann. Rev. Biochem., 42, 439.

225 STEITZ, J.A. (1969). Nature, 224, 957.

226 HORIUCHI, K., LODISH, H. et ZINDER, N. (1966). Virology, 28, 438.

227 GUSSIN, G.N. (1966). J. Mol. Biol., 21, 435.

228 LODISH, H.F. (1970). J. Mol. Biol., 50, 689.

229 GUPTA, S., CHEN, J. SCHAEFER, L., LENGYEL, A. et WEISSMAN, S. (1970). Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 883.

230 KOZAK, M. et NATHANS, D. (1972). Bact. Rev., 33, 264.

231 STEITZ, S.A., DUBE, S.R. et RUDLAND, P.S. (1970). Nature, 226, 824.

232 LEE HUANG, S. et OCHOA, S. (1971). Nature New. Biol., 234,237.

233 REVEL, M., POLLACK, Y., GRONER, Y., SCHEPS, R., INOUYE, H., BERISSI, H. et ZELIER, H. (1973). Biochimie, 55, 51.

234 WAHBA, A.J., MILLER, H.J., NIVELEAU, A., LANDERS, T. CARMICHAEL, G.C., WEBER, K., HAWLEY, D.A. et SLOBIN, L.I. (1974). J. Biol. Chem., 249, 3314.

235 MASCHLER, R. Communication personnelle.

236 JAY, G. et KAEMPFER, R. (1974). J. Mol. Biol., 82, 193.

237 LEFFLER, S. et SZER, W. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 70, 2364.

238 STEITZ, J.A. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 70, 2605.

239 GRALLA, J., STEITZ, J.A. et CROTHERS, D.M. (1974). Nature, 248, 204.

240 STENT, G.S. (1966). Proc. Roy. Soc. B., 164, 181.

241 CONTESSE, G., NAONO, S. et GROS, F. (1966). C.R. Acad. Sci., Paris, 263, 1007.

242 IMAMOTO, F., ITO, J. et YANOFSKY, C. (1966). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 235.

243 REVEL, M., HERZBERG, M., BECAVERIC, A. et GROS, F. (1968). J. Mol. Biol., 33, 231.

244 REVEL, M., HERZBERG, M. et GREENSHPAN, H. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 261.

245 ROUVIERE, J., LEDERBERG, S., GRANBOULAN, P. et GROS, F. (1969). J. Mol. Biol., 46, 413.

246 REVEL, M. et GROS, F. (1966). Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, 124.

247 MORSE, D.E., BAKER, R.F. et YANOFSKY, C. (1968). Proc.Natl. Acad. Sci., 60, 1428.

248 MILLER, O.L., HAMKALI, B.A. et THOMAS, C.A. (1970). Science, 169, 392.

249 CREPIN, M., LELONG, J.C. et GROS, F. (1973). Harolinska symposia on research methods in reproduction endocrinology 6th symposium pp. 33.

250 IMAMOTO, F. et KANO, Y. (1971). Nature New Biol., 232, 169.

251 IHLER, G. et NAKADA, D. (1970). Nature, 228, 239.

252 IHLER, G. et NAKADA, D. (1971). J. Mol. Biol., 62, 419.

253 ROBERTSON, H.D. (1975). J. Mol. Biol., 92, 363.

254 FORCHHAMMER, J., JACKSON, E.N. et YANOFSKY, C. (1972). J. Mol. Biol., 71, 687.

255 MORSE, D.E., MOSTELLER, R.D., BAKER, R.F. et YANOFSKY, C. (1969). Nature, 223, 40.

256 MORIKAWA, M. et IMAMOTO, F. (1969). Nature, 223, 37.

257 JACQUET, M. et KEPES, A. (1971). J. Mol. Biol., 60, 453.

258 MANGIAROTTI, G. et TURCO, E. (1973). Eur. J. Biochem.,38,507.

259 FORCHHAMMER, J. et LINDAHL, L. (1971). J. Mol. Biol., 55,363.

260 MANOR, H., GOODMANN, D. et STENT, G.S. (1969). J. Mol. Biol. 39, 1.

261 BREMER, H. et YUAN, D. (1968). J. Mol. Biol., 38, 163.

262 BLUMENTHAL, T., LANDERS, T.A. et WEBER, K. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 1313.

263 HESSELBACH, B.A., YAMADA, Y. et NAKADA, D. (1974). Nature, 252, 71.

264 BLOCK, R. et HASELTINE, W.A. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory pp. 747.

265 VAN OOYEN, A., DE BOER, H., AB, G. et GRUBER, M. (1975). Nature, 254, 530.

266 TRAVERS, A. (1973). Nature, 244, 15.

267 DE CROMBRUGGHE, B., CHEN, B. GOTTESMAN, M., PASTAN, I., VARMUS, H.E., EHMER, M. et PERLMAN, R.L. (1971). Nature New Biol., 230, 37.

268 YANG, H.L., ZUBAY, G., URM, E., REINISS, G. et CASHEL, M. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 63.

269 RABBANI, E. et SRINIUASAN, P.Q. (1973). J. Bact., 113, 1173.

270 ATHERLY, A.G. (1973). J. Bact., 113, 178.

271 KIMURA, A., MUTO, A. et OSAWA, S. (1974). Mol. Gen. Genet., 130, 203.

272 KUWANO, M. et SCHLESSINGER, D. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 66, 146.

273 FRIESEN, J.D., FIIL, N.P., PARKER, J.M., et HASELTINE, W.A., (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 3465.

274 CHAKRABARTI, S.L. et GORINI, L. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 72, 2084.

275 NOMURA, M. (1975). FEBS Meeting Paris.

276 LINDAHL, L., JASKUNAS, R.S., DENNIS, P.P. et NOMURA, M. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 72, 2743.

277 LAFFLER, T. et GALLANT, J. (1974). The Cell, 1, 27.

278 EDLIN, G. et BRODA, P. (1968). Bact. Rev., 32, 306.

279 RYAN, A.M. et BOREK, E. (1971). Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., II, 193.

280 CASHEL, M. et GALLANT, J. (1974) dans Ribosomes Cold Spring Harbor Laboratory pp. 733.

281 ROSSET, R., MONIER, R. et JULIEN, J. (1964). Biochem. Biophys. Res. Com., 15, 329.

282 ROSSET, R., JULIEN, J. et MONIER, R. (1966). J. Mol. Biol., 18, 308.

283 GOODMAN, D., MANOR, H. et ROWBAUTS W. (1969). J. Mol. Biol., 40, 241.

284 DENNIS, P.P. et NOMURA, M. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 71, 3819.

285 DENNIS, P.P. et NOMURA, M. (1975). Nature, 255, 460.

286 GULLØV, K., von MEYENBURG, K. et MOLIN, S. (1974). Mol. Gen.Genet., 130, 271.

287 GAUSING, K. (1974). Mol. Gen. Genet., 129, 61.

288 DALBOW, D.G. (1973). J. Mol. Biol., 75, 81.

289 SKJOLD, A.C., JUAREZ, H. et HEDGCOTH, C. (1973). J. Bacteriol., 115, 177.

290 GORDON, J. (1970). Biochemistry, 9, 412.

291 ENNIS, H.L. (1971). Arch. Biochem. Biophys., 142, 190.

292 VARRICHIO, F. et MONIER, R. (1971). J. Bacteriol., 108, 105.

293 PARENTI-ROSINA, R., EISENSTADT, A. et EISENSTADT, J.M.(1969). Nature, 221, 363.

294 YOUNG, R. et NAKADA, D. (1970). Nature, 227, 604.

295 YOUNG, R. et NAKADA, D. (1971). J. Mol. Biol., 57, 457.

296 KAEMPFER, R. et MESELSON, M. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 209.

297 DAGLEY, S. et SYKES, J. (1960). Biochem. J., 74, 11 P.

298 GOTTESMAN, M.G. (1967). J. Biol. Chem., 242, 5564.

299 CAMERON, H.J. et JULIAN, G.R. (1968). Biochem. Biophys. Acta, 169, 373.

300 HALL, B. et GALLANT, J. (1972). Nature New Biol., 237, 131.

301 BLOCK, R. et HASELTINE, W.A. (1973). J. Mol. Biol., 77, 625.

302 HANSEN, M.T. BENNETT, P. et von MEYENBURG, K. (1973). J. Mol. Biol., 77, 589.

303 SCHEPS, R. et REVEL, M. (1972). Eur. J. Biochem., 29, 319.

304 SABOL, S. et OCHOA, S. (1971). Nature New Biol., 234, 233.

305 THIBAULT, J., CHESTIER, A., VIDAL, D. et GROS, F. (1972). Biochimie, 54, 829.

306 OUDIN, J. (1946). Compt. rendus. Acad. Sci. Paris, 222, 115.

307 HURWITZ, J., FURTH, J.J., ANDERS, M., ORTIZ, P.J. et AUGUST, J.T. (1965). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 30, 91.

308 KORNBERG, A., KORNBERG, S.R. et SIMMS, E.S. (1956). Biochim. Biophys. Acta, 20, 215.

309 KORNBERG, A. (1957). Biochim. Biophys. Acta, 26, 294.

310 SUBRAMANIAN, A., RON, E. et DAVIS, B. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 61, 761.

311 WAHBA, A., CHAE, Y., IWASAKI, K., MAZUMDER, R., MILLER, M., SABOL, S. et SILLERO, M. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 285.

312 SABOL, S., SILLERO, M., IWASAKI, K. et OCHOA, S.(1970). Nature, 228, 1269.

313 SUBRAMANIAN, A. et DAVIS, B. (1970). Nature, 228, 1273.

314 ALBRECHT, J., STAP, F., VOORMA, H., van KNIPPENBERG, P. et BOSCH, L. (1970). FEBS Lett., 6, 297.

315 KAEMPFER, R. (1972). J. Mol. Biol., 71, 583.

316 NOLL, M. et NOLL, H. (1972). Nature New Biol. 238, 225.

317 SABOL, S., MEIER, D. et OCHOA, S. (1973). Eur. J. Biochem., 33, 332.

318 BADE, E.G., GONZALES, N.S. et ALGRANATI, I.D. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 64, 654.

319 GARCIA PATRONE, M., GONZALES, N.S. et ALGRANATI, I.D. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 68, 2822.

320 KAEMPFER, R. (1974). Dans Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 679.

321 ALGRANATI, I.D., GONZALES, N.S. et BADE, E.G. (1968). Biochemistry, 62, 574.

322 KAEMPFER, R. (1970). Nature, 228, 534.

323 SCHLESSINGER, D., MANGIAROTTI, G. et APIRION, D. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 58, 1782.

324 LAVALLE, R. Communication personnelle.

325 LAVALLE, R. et de HAUWER, G. (1968). J. Mol. Biol., 37, 269.

326 COZZONE, A. et DONINI, P. (1973). J. Mol. Biol., 76, 149.

327 GURGO, C., CRAIG, E., SCHLESSINGER, D. et AFOLOYAN, D. (1971). J. Mol. Biol., 62, 525.

328 GOLDBERG, A.L. (1971). Nature New Biol., 234, 51.

329 MANDELSTAM, J. (1958). Biochem. J., 69, 110.

330 SCHLESSINGER, D. et BEN-HAMIDA, F. (1966). Biochim. Biophys. Acta, 119, 171.

331 SUSSMAN, A.J. et GILVARG, C. (1969). J. Biol. Chem., 244, 6304.

332 THANG, M.N. Communication personnelle.

333 PATTERSON, D. et GILLESPIE, D. (1971). Biochem. Biophys. Res. Com., 45, 476.

334 SPRINGER, M. et GRUNBER-MANAGO, M. (1975). FEBS Meeting Paris.

335 JAY, G. et KAEMPFER, R. (1975). J. Biol. Chem., 250, 5749.

336 GRONER, Y., POLLACK, Y., BERISSI, H. et REVEL, M. (1972). Nature New Biol., 239, 16.

337 SY, J., CHUA, N.H., OGAWA, Y. et LIPMAN, F. (1974).Biochem. Biophys. Res. Com., 56, 611.

338 LUND, E. et KJELDGAARD, N.O. (1972). Eur. J. Biochem., 28, 316.

339 CASHEL, M. et GALLANT, J. (1969). Nature, 221, 838.

340 CASHEL, M. et KALBACHER, B. (1970). J. Biol. Chem., 245,2309.

341 THANG, M.N., DONDON, L. et THANG, D.C. (1972). FEBS Letters, 26, 145.

342 ANDERSON, J.S., BRETSCHER, M.S., CLARK, B.F.C. et MARCKER, K.A. (1967). Nature, 215, 490.

343 BENNE, R., NAATGEBOREN, N., GUBBENS, J. et VOORMA, H.O. (1973). Eur. J. Biochem., 32, 372.

344 FAKUNDING, J.L. et HERSHEY, J.W.B. (1973). J. Biol. Chem., 248, 4206.

345 ZIMMERMAN, R.A., ROSSET, R. et GORINI, L. (1971). J. Mol. Biol., 57, 403.

346 ARAI, K.I., ARAI, N., KAWAKITA, M. et KASIRO, Y. (1972). Biochem. Biophys. Res. Com., 48, 190.

347 YOSHIDA, M., TRAVERS, A. et CLARK, B.F.C. (1972). FEBS Letters, 23, 163.

348 LEGAULT, L., JEANTET, C. et GROS, F. (1972). FEBS Letters, 27, 71.

349 HASELTINE, N.A., BLOCK, R., GILBERT, W. et WEBER, N. (1972). Nature, 238, 381.

350 HASELTINE, W.A. et BLOCK, R. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 70, 1564.

351 Van KNIPPENBERG, P.J., Van DUIN, J. et LENTZ, H. (1973). FEBS Letters, 34, 95.

352 BOYLE, S.M. et SELLS, B.H. (1974). Biochem. Biophys. Res. Com., 57, 23.

353 ALFOLDI, L., STENT, G., HOOGS, M. et HILL, B. (1963). Z. Vererbunge, 94, 285.

354 SOKAWA, Y., SOKAWA, J. et KAZIRO, Y. (1971). Nature New Biol., 234, 7.

355 PUTNAM, F.W., TAN, M., LYNN, L.T., EASLEY, C.W. et MIGITA, S. (1962). J. Biol. Chem., 237, 717.

356 MASCHLER, R. (1974). Ph. D. Thesis; Freie Universität, Berlin.

357 GESTELAND, R.F., SALSER, W. et BOLLE, A. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 58, 2036.

358 LEGAULT-DEMARE, L., JEANTET, C. et GROS, F. (1973). Mol. Gen. Genet., 125, 301.

359 SALSER, W., GESTELAND, R.F. et BOLLE, A. (1967). Nature, 215, 588.

360 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, L. et RANDALL, R.J. (1951). J. Biol. Chem., 193, 265.

361 OUDIN, J. (1955). Ann. Inst. Pasteur, 89, 531.

362 BROWNLEE, C.G., SANGER, F. et BARREL, B.G. (1968). J. Mol. Biol., 34, 379.

363 GRIFFIN, B.E. et BAILLIE, O.L. (1973). FEBS Letters, 34, 273.

364 CAMMACK, K.A. et WADE, H.E. (1965). Biochem. J., 96, 671.

365 SEKIGUCHI, M. et IIDA, S. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 58, 2315.

366 DUGNOFF, J.S. et MAITRA, U. (1971) dans Methods enzymol. (Moldave, K. et Grossman, L. eds), vol. 20, part. C, pp. 248. New-York - London : Academic Press.

367 LELONG, J.C., COUSIN, M.A., GROS, D., GRUMBERG-MANAGO, M. et GROS, F. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun., 42,530.

368 HERZBERG, M., LELONG, J.C. et REVEL, M. (1969). J. Mol. Biol., 44, 297.

369 O'DONNEL, E.R. et THACH, R.E. (1970). J. Biol. Chem., 245, 5737.

370 KOLAKOFSKI, D., DEWEY, K.F., HERSHEY, J.W.B. et THACH, R.E. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 61, 1066.

371 THANG, M.N., SPRINGER, M., THANG, D.S. et GRUNBERG-MANAGO, M. (1971). FEBS Letters, 17, 221.

ABREVIATIONS

Arg : Arginine

AMP, CMP, GMP, UMP : respectivement, acide adénylique, cytidylique, guanylique et uridylique.

ATP, CTP, GTP, UTP : respectivement adénosine, cytidine, guanosine et uridine triphosphate.

GDP, ppGpp, pppGpp : respectivement guanosine diphosphate, tétraphosphate, pentaphosphate.

GMP - PCP : 5' - Guanylyl méthylène diphosphonate.

CAM : chloramphénicol.

DNA : acide desoxyribonucléique.

DNAse : Desoxyribonucléase.

DNP : 2-4 dinitrophénol.

EDTA : Diethylaminoethylcellulose.

EF Tu, EF Ts, EFG : facteurs d'élongation Tu, Ts, G.

Fab : Fragment antigen binding.

fMet tRNA : N-formylmethionyl-tRNA.

5 Fu : 5 Fluorouracile.

IF : fraction brute de facteurs d'initiation.

IF 1, IF 2, IF 3 : facteurs d'initiation 1, 2, 3.

IF CAM : fraction brute de facteurs d'initiation extraits de bactéries traitées par le chloramphénicol.

Ig G : Immunoglobuline.

Met : Methionine.

MSI, MSII : respectivement magic spot I (=ppGpp) et magic spot II (=pppGpp).

nm : nanomole.

PEP : phosphoénolpyruvate.

PFP : parafluorophénylalanine.

Phe : phénylalanine.

Phe tRNA : phénylalanyl tRNA.

PK : Pyruvate kinase.

Poly U : acide polyuridylique.

Poly Phe : polyphénylalanine.

PMSF : phénylméthane sulfonyl fluoride

Puro : puromycine

RNA : acide ribonucléique

mRNA, rRNA, tRNA : respectivement acide ribonucléique messager, ribosomique, de transfert.

RNAse : ribonucléase

TCA : acide trichloracétique

TF ms : Transcription Factor magic spot.

Tris : 2 amino-2-hydroxyméthyl 1-3 propandiol

Val : valine.

· IMPRIME A L'INSTITUT PASTEUR ·